

MARIANA ARZUA DE QUEIROZ

**AVALIAÇÃO DE PRÉ-MUTAÇÃO POR PCR NA
SÍNDROME DO X FRÁGIL**

FLORIANÓPOLIS

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DE PRÉ-MUTAÇÃO POR PCR NA
SÍNDROME DO X FRÁGIL**

Dissertação submetida à
Universidade Federal de Santa Catarina
como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

MARIANA ARZUA DE QUEIROZ

Florianópolis, dezembro de 2006

AVALIAÇÃO DE PRÉ-MUTAÇÃO POR PCR NA SÍNDROME DO X FRÁGIL

Mariana Arzua de Queiroz

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química, Área de Concentração em *Processos Químicos e Biotecnológicos*, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Luismar Marques Porto – UFSC
Orientador

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior – UFSC
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luismar Marques Porto – EQA/CTC/UFSC
Presidente

Profa. Dra. Angélica Francesca Maris – UNOESC
Membro externo

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares – EQA/CTC/UFSC
Membro interno

Florianópolis, dezembro de 2006

Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina e foi desenvolvido no setor de Genética Molecular do Neurogene Laboratório de Genética Humana.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Luismar Marques Porto, pela oportunidade de ingressar no Grupo de Engenharia Genômica, pela orientação, dedicação e amizade.

Faço um agradecimento especial à Ingrid Tremel Barbato pelo grande incentivo, amizade e exemplo de dedicação à busca de uma melhor qualidade de vida àqueles que convivem com a Síndrome do X Frágil.

Sou muito grata ao Laboratório Neurogene, que financiou dois anos de pesquisa e possibilitou a execução deste trabalho e aos pacientes e seus familiares que autorizaram a análise de suas amostras e viabilizaram esta pesquisa.

Agradeço também:

Às colegas do Laboratório Neurogene pela amizade e pelas proveitosas discussões, em especial à Pricila, que assumiu prontamente minhas tarefas quando precisei me ausentar.

Aos colegas do Intelab, principalmente à Gisele, pela troca de conhecimentos e pelo companheirismo.

Ao meu sogro Diomário e ao querido Max pela suas importantes contribuições na revisão desta dissertação e pelo incentivo à pesquisa científica.

À família e aos amigos que, distantes ou próximos, compreenderam minha ausência e me apoiaram para que mais esta etapa fosse vencida.

Ao meu querido esposo Max, que esteve comigo em todos os momentos, pelo apoio e amor que me motivaram a alcançar os objetivos deste trabalho.

Por fim, dou graças a Deus pela vida.

Resumo da Dissertação apresentada à UFSC como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

AVALIAÇÃO DE PRÉ-MUTAÇÃO POR PCR NA SÍNDROME DO X FRÁGIL

Mariana Arzua de Queiroz

Dezembro/2006

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Área de Concentração: Processos Químicos e Biotecnológicos

Palavras-chave: Síndrome do X Frágil, diagnóstico laboratorial, *Enhanced* PCR, repetições de CGG, pré-mutação, doença genética hereditária.

Número de Páginas: 89.

A presente dissertação avalia o desempenho de uma nova metodologia de análise molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR), conhecida como *Enhanced* PCR, no diagnóstico da Síndrome do X Frágil (SXF), e faz um estudo comparativo com a técnica padrão. A SXF é causada pela expansão da repetição de uma sequência de trinucleotídeos (CGG) na região reguladora do gene FMR1, localizado no cromossomo X (Xq27.3). Indivíduos portadores da síndrome são classificados em zona gray, pré-mutados ou afetados, conforme o número de repetições de CGG presentes no gene. Técnicas de PCR são utilizadas como triagem e suas limitações dificultam a conclusividade do diagnóstico de mulheres normais homozigotas, e de homens e mulheres com grandes expansões de repetições de CGG. Para comparação da eficácia de diagnóstico das técnicas avaliadas, o DNA de 122 pacientes foi extraído e submetido a dois métodos de PCR, conforme os protocolos descritos na literatura, aqui denominados PCR de Triagem (PCR-T) e PCR para Pré-mutação (PCR-P). A nova metodologia, PCR-P, produziu 60% de resultados conclusivos contra 26% de conclusividade pela técnica padrão (PCR-T). Alelos de até 130 CGG em mulheres e 93 CGG em homens foram amplificados pela PCR-P, possibilitando, assim, o diagnóstico de pré-mutação. Por outro lado os maiores alelos amplificados pela PCR-T foram de apenas 41 CGG em mulheres e 46 CGG em homens, ou seja, a técnica padrão, como está limitada ao diagnóstico da zona gray, não permitiu a identificação de alelos pré-mutados. A partir destas observações propõe-se uma estratégia para o diagnóstico da síndrome utilizando a PCR-P na pesquisa de pré-mutação em pais de indivíduos com resultados inconclusivos. Considerando os resultados bem sucedidos e aprimorados da nova técnica de PCR, incluindo o fácil diagnóstico da pré-mutação, sugere-se a sua implementação em laboratórios de genética para o diagnóstico da SXF.

Abstract of Dissertation presented to UFSC as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Chemical Engineering.

EVALUATION OF FRAGILE X SYNDROME PRE-MUTATION BY PCR

Mariana Arzua de Queiroz

December/2006

Advisor: Prof. Luismar Marques Porto, PhD

Area of Concentration: Chemical and Biotechnological Processes

Keywords: Fragile X Syndrome, laboratorial diagnosis, Enhanced PCR, CGG repeats, pre-mutation, hereditary genetic illness.

Number of Pages: 89.

The current dissertation evaluates the performance of a new methodology of molecular analysis by polymerase chain reaction (PCR), known as Enhanced PCR, in the diagnosis of the Fragile X Syndrome (FXS), and makes a comparative study with the standard technique. The FXS is caused by an expansion of trinucleotides (CGG) repeats sequence in the promoter region of gene FMR1, located in the X chromosome (Xq27.3). Carriers are classified in gray zone, pre-mutation or full mutation, according to the number of CGG repeats in the gene. PCR techniques are used as screening tests and its limitations make it difficult to obtain conclusive diagnosis for normal homozygote women, and for men and women with large expansion of CGG repeats. In order to compare the diagnosis effectiveness of the evaluated techniques, the DNA of 122 patients was extracted and submitted to two PCR methods, according to their protocols in literature, called Screening PCR (PCR-T) and Enhanced PCR (PCR-P). The new methodology, PCR-P, produced 60% of conclusive results against 26% of conclusiveness by the standard technique (PCR-T). Alleles up to 130 CGG in women and 93 CGG in men have been amplified by the PCR-P, making possible, thus, the diagnosis of pre-mutation. On the other hand the largest alleles amplified by the PCR-T had only 41 CGG in women and 46 CGG in men, i.e. the standard technique didn't allow the identification of pre-mutation alleles, since it is limited to the diagnosis of gray zone. From these observations, a FXS diagnosis strategy is proposed, which makes use of PCR-P for pre-mutation research in relatives of those patients with inconclusive results. Considering the successful and improved results by the new PCR technique, including the easy diagnosis of pre-mutation, its implementation in genetics laboratories for FXS diagnosis is suggested.

Sumário

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | XI |
| LISTA DE TABELAS..... | XIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XIV |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E PROBLEMA DE PESQUISA | 1 |
| 1.2 OBJETIVOS | 4 |
| 1.3 JUSTIFICATIVA | 4 |
| 1.4 ESTRUTURA DO DOCUMENTO..... | 5 |
| 2. A SÍNDROME DO X FRÁGIL | 6 |
| 2.1 O GENE FMR1 E A PROTEÍNA FMRP..... | 6 |
| 2.1.1 O gene FMR1 em plataformas online..... | 8 |
| 2.2 SÍTIOS FRÁGEIS NO CROMOSSOMO X | 9 |
| 2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS INDIVÍDUOS PORTADORES DA SXF | 9 |
| 2.4 PREVALÊNCIA POPULACIONAL DA SXF | 11 |
| 2.5 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS INDIVÍDUOS PORTADORES DA SXF..... | 11 |
| 2.6 HERANÇA E PADRÃO DE TRANSMISSÃO DO NÚMERO DE REPETIÇÕES DE CGG | 14 |
| 2.7 PADRÃO DE MOSAICISMO EM REPETIÇÕES DE CGG E METILAÇÃO..... | 15 |
| 3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA SÍNDROME DO X FRÁGIL | 17 |
| 3.1 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA A SÍNDROME DO X FRÁGIL | 17 |
| 3.1.1 Análise Citogenética..... | 18 |
| 3.1.2 PCR e Southern Blotting..... | 19 |
| 3.1.3 PCR para Pesquisa da Metilação | 21 |
| 3.1.4 PCR de Transcrição Reversa | 22 |
| 3.1.5 Sequenciamento do DNA | 23 |
| 3.1.6 Teste de Imunocitoquímica..... | 23 |
| 3.1.7 Teste de Imunohistoquímica | 24 |
| 3.2 INDIVÍDUOS QUE DEVEM SER TESTADOS PARA A SÍNDROME DO X FRÁGIL..... | 26 |
| 3.3 ACONSELHAMENTO GENÉTICO E TRATAMENTO DA SÍNDROME DO X FRÁGIL..... | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 AMOSTRAGEM..... | 29 |
| 4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO..... | 29 |
| 4.3 PROTOCOLO DA TÉCNICA DE PCR DE TRIAGEM (PCR-T)..... | 29 |
| 4.3.1 <i>Amplificação da Sequência Alvo por PCR-T</i> | 31 |
| 4.3.2 <i>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</i> | 31 |
| 4.3.3 <i>Visualização dos Produtos da PCR e Determinação do Número de Repetições de CGG</i> | 32 |
| 4.4 PROTOCOLO DA TÉCNICA DE <i>ENHANCED</i> PCR OU PCR PARA PRÉ-MUTAÇÃO (PCR-P)..... | 33 |
| 4.4.1 <i>Amplificação da Sequência Alvo por PCR</i> | 34 |
| 4.4.2 <i>Eletroforese em Gel de Agarose</i> | 34 |
| 4.4.3 <i>Visualização dos Produtos da PCR e Determinação do Número de Repetições de CGG</i> | 35 |
| 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 35 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 5.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS PROCEDIMENTOS DE PCR | 37 |
| 5.1.1 <i>Diagnósticos Conclusivos e Inconclusivos</i> | 37 |
| 5.1.2 <i>Diagnósticos Conclusivos nos Diferentes Grupos Classificatórios: Normal, Zona Gray e Pré-mutado</i> | 42 |
| 5.1.3 <i>Diagnósticos Conclusivos nos Diferentes Grupos Classificatórios e sua Relação com a Indicação Clínica dos Pacientes</i> | 46 |
| 5.1.4 <i>Análise de Variação do Número de Repetições de CGG das Amostras Analisadas pela Técnica de PCR-T em Comparação com a PCR-P</i> | 48 |
| 5.1.5 <i>Variação no Número de Repetições de CGG das Amostras Analisadas em Duplicata pela Técnica de PCR-T e PCR-P</i> | 48 |
| 5.1.6 <i>Ocorrências do Número de Repetições de CGG e Provável Frequência Alélica na População do Estado de Santa Catarina</i> | 49 |
| 5.1.7 <i>Interpretação e Visualização dos Produtos da Amplificação da PCR-T e PCR-P em Géis de Agarose e Poliacrilamida</i> | 50 |
| 5.2 PROPOSTA DE ESTRATÉGIA PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA SXF..... | 56 |
| 5.3 RASTREAMENTO DA PRÉ-MUTAÇÃO DA SÍNDROME DO X FRÁGIL | 60 |
| 5.4 NOVAS INFORMAÇÕES EM LAUDOS DE PESQUISA DO GENE FMR1 POR PCR..... | 61 |

| | |
|--|-----------|
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 64 |
| 6.1 CONCLUSÕES | 65 |
| 6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 68 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 69 |

Lista de Figuras

- Figura 1. Representação do gene FMR1 e localização das repetições no gene (Fonte: Serpa, 2006. Comunicação pessoal). 7
- Figura 2. Visualização do sítio frágil no cromossomo X, região Xq27.3 (seta), em Cariótipo (Fonte: Laboratório Neurogene, 2006. Comunicação pessoal). 18
- Figura 3. Esquema representativo da técnica de Imunocitoquímica. a) representação de linfócito positivo para FMRP. b) visualização de células em microscópio óptico. 1. linfócito positivo (halo vermelho), 2. linfócito negativo e 3. outra célula (Fonte: Serpa, 2006. Comunicação pessoal). 23
- Figura 4. Local de anelamento dos iniciadores C, F e 2 no gene FMR1, em negrito, e repetições de cgg, em itálico sublinhado. 30
- Figura 5. a) Representação da visualização dos produtos de PCR-T em gel de poliacrilamida. b) Representação da visualização dos produtos da PCR-P em gel de agarose. Resultados de pacientes normais do sexo masculino estão representados nas fileiras 1, zona gray nas fileiras 3, inconclusivo nas fileiras 5, e pré-mutação na fileira 7. Resultados de pacientes normais do sexo feminino estão representados nas fileiras 2, zona gray nas fileiras 4, inconclusivo nas fileiras 6, e pré-mutação na fileira 8. “MPM” se refere a marcador de peso molecular e “pb” a pares de bases. 33
- Figura 6. Esquema para definição de diagnóstico conclusivo ou inconclusivo de pacientes do sexo masculino (à esquerda) e feminino (à direita). 38
- Figura 7. Influência da técnica de PCR para Pré-Mutação (PCR-P) em comparação com a PCR de Triagem (PCR-T) no diagnóstico de pacientes com indicação clínica para a síndrome de X-Frágil. O percentual de diagnósticos conclusivos e inconclusivos, para todos os pacientes analisados, é mostrado através das barras verticais e o número de casos na tabela adjacente. 39
- Figura 8. Número e percentual de diagnósticos conclusivos e inconclusivos em pacientes do sexo feminino com indicação clínica para a síndrome de X-Frágil, quando analisados pela técnica de PCR-P em comparação com a técnica de PCR-T..... 40

| | |
|--|----|
| Figura 9. Número e percentual de diagnósticos conclusivos e inconclusivos em pacientes do sexo masculino com indicação clínica para a síndrome de X-Frágil, quando analisados pela técnica de PCR-P em comparação com a técnica de PCR-T..... | 41 |
| Figura 10. Distribuição dos pacientes com diagnóstico conclusivo nos diferentes grupos classificatórios (normal, zona gray e pré-mutado), empregando-se as técnicas de PCR-T e PCR-P. a) Pacientes do sexo feminino, b) Pacientes do sexo masculino..... | 44 |
| Figura 11. Número de ocorrências das repetições de CGG, de acordo com os alelos mais frequentemente observados pelas técnicas de PCR-T e PCR-P, em 115 pacientes analisados do Estado de Santa Catarina..... | 50 |
| Figura 12. Visualização dos fragmentos amplificados pela PCR-T em gel de poliacrilamida. Alelos normais de pacientes do sexo masculino estão localizados nas fileiras 1, 2 e 4, alelo zona gray na fileira 3 e resultado inconclusivo na fileira 6. Alelos normais de pacientes do sexo feminino encontram-se na fileira 5 e resultado inconclusivo na fileira 7. “MPM” se refere a marcador de peso molecular e “pb” a pares de bases..... | 51 |
| Figura 13. Visualização dos fragmentos amplificados pela PCR-P em gel de agarose. Alelos normais de pacientes do sexo masculino estão localizados nas fileiras 1 e 2, pré-mutado na fileira 3, e zona gray na fileira 7. Alelos normal e pré-mutado de pacientes do sexo feminino estão na fileira 4, um alelo normal (resultado inconclusivo) na fileira 5, dois normais na fileira 6, e normal e zona gray na fileira 8. “MPM” se refere a marcador de peso molecular e “pb” a pares de bases e “ZG” a zona gray. | 52 |
| Figura 14. Fluxograma proposto para diagnóstico laboratorial da SXF em mulheres com suspeita clínica ou histórico familiar para a síndrome..... | 57 |
| Figura 15. Fluxograma proposto para diagnóstico laboratorial da SXF em homens com suspeita clínica ou histórico familiar para a síndrome..... | 58 |
| Figura 16. Laudo-sugestão para (a) PCR-T (Fu <i>et al.</i> , 1991) e (b) PCR-P (Saluto <i>et al.</i> , 2005) de pacientes do sexo feminino, mostrando no rodapé (no item Observação) os dados da incidência registrados nesta pesquisa. | 62 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Números de acesso a informações do gene FMR1 nas plataformas online GenBank e OMIM. | 9 |
| Tabela 2. Interpretação de resultados de exames de diagnóstico para a SXF em número de repetições de CGG classificados em quatro categorias. | 10 |
| Tabela 3. Finalidade, vantagens e desvantagens dos métodos de diagnóstico da SXF. | 25 |
| Tabela 4. Iniciadores utilizados na amplificação dos alelos do gene FMR1 pelas técnicas de PCR-T e PCR-P. | 31 |
| Tabela 5. Número de pacientes com diagnóstico conclusivo e sua distribuição nos grupos classificatórios (normal, zona gray e pré-mutado). Dados comparativos das técnicas de PCR-T e PCR-P. | 42 |
| Tabela 6. Número de casos diagnosticados com diferentes classificações pelas duas técnicas de PCR, de um total de 32 casos estudados. | 45 |
| Tabela 7. Número do total de pacientes com diagnóstico conclusivo, sua distribuição nos grupos classificatórios (normal, zona gray e pré-mutado) e a correlação com a indicação clínica. Dados comparativos das técnicas de PCR-T e PCR-P. | 47 |
| Tabela 8. Resultados obtidos de acordo com as técnicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial da SXF, de 122 pacientes estudados, e correlação com o sexo e indicação clínica. | 55 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|--------|--|
| ADNPM | Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Ácido Desoxiribonucleico |
| dNTPs | Desoxinucleotídeos Trifosfato |
| EDTA | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| FMR1 | <i>Fragile X Mental Retardation 1 Gene</i> |
| FMRP | <i>Fragile X Mental Retardation Protein</i> |
| FRAXA | <i>Fragile site, X chromosome, A site</i> |
| FRAXE | <i>Fragile site, X chromosome, E site</i> |
| FXTAS | <i>Fragile X Associated Tremor/Ataxia Syndrome</i> , Síndrome de Tremor/Ataxia Associada ao X Frágil |
| ms-PCR | <i>Methylation Specific PCR</i> , PCR Específica para Metilação |
| PCR | <i>Polimerase Chain Reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase |
| PCR-P | PCR para Pré-mutação, <i>Enhanced PCR</i> |
| PCR-T | PCR de Triagem |
| POF | <i>Precoce Ovarian Failure</i> , Falha Ovariana Precoce |
| q.s.p. | Quantidade suficiente para |
| RM | Retardo Mental |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> , Ácido Ribonucleico |
| mRNA | <i>Messenger RNA</i> , RNA mensageiro |
| SXF | Síndrome do X Frágil |
| TAE | Tris-acetato-EDTA |
| TBE | Tris-borato-EDTA |
| TDA-H | Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano |
| U | Unidade |
| UTR | <i>Untranslated Region</i> , Região Não Traduzida |

1. Introdução

1.1 Contextualização e Problema de Pesquisa

A Síndrome do X Frágil (SXF) é um distúrbio hereditário que causa retardo mental e foi reportada pela primeira vez em 1943 por Martin e Bell em uma família com retardo mental ligado ao cromossomo X (Martin e Bell, 1943). Indivíduos afetados pela SXF possuem um comprometimento da saúde mental variável, que pode ir desde uma dificuldade no aprendizado até um retardo mental severo. Outros sintomas clínicos também podem estar presentes, tais como: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, hiperatividade, déficit de atenção, atraso na fala e dificuldade de interação social. As características físicas mais marcantes dos indivíduos afetados são face alongada, testa proeminente e macroorquidismo (Hagerman e Hagerman, 2002a). A síndrome é a forma mais comum de retardo mental herdada e, de acordo com os trabalhos de Crawford e colaboradores, afeta 1 em cada 3.600 homens e 1 entre cada 6.000 mulheres (Crawford *et al.*, 2001; Crawford *et al.*, 2002).

A expansão da repetição de uma sequência de trinucleotídeos CGG na região promotora do gene FMR1 (*Fragile X Mental Retardation 1*), situado na região terminal do cromossomo X (Xq27.3), é considerada a causa da doença. Os indivíduos afetados apresentam mais de 200 repetições de CGG, normalmente acompanhada de metilação, o que leva à repressão da transcrição do gene e ausência da (proteína) FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*). A FMRP é o produto final do gene, que pode estar presente em diferentes isoformas. Os sintomas característicos da síndrome parecem estar sempre associados à deficiência da proteína (Fu *et al.*, 1991; Verkerk *et al.*, 1991). Mulheres afetadas pela SXF, por possuírem dois cromossomos X, podem produzir FMRP a partir do cromossomo X normal e, quando apresentam comprometimento intelectual, os sintomas são brandos e a deficiência mental é leve (Hagerman e Hagerman, 2002a).

O número de repetições de CGG é polimórfico na população, e em indivíduos normais pode variar de 6 a 40 CGG. Os alelos mais frequentes são os de 28, 29 e 30 CGG. A mutação no gene FMR1, causada pela expansão do número de repetições de

CGG, caracteriza três grupos de portadores da SXF: zona gray, pré-mutados e afetados (mutação completa). Indivíduos zona gray apresentam de 40 a 60 repetições de CGG, sendo a transmissão estável entre gerações. A pré-mutação é caracterizada pela presença de 61 a 200 repetições de CGG e pela transmissão instável entre gerações, que pode levar à mutação completa (>200 CGG). Nestes casos a transmissão está diretamente relacionada com o número de repetições de CGG: quanto maior a expansão da pré-mutação, maior a probabilidade e transmissão da mutação completa. Além disso, o padrão de transmissão da pré-mutação para a mutação completa ocorre quase exclusivamente de mulheres para os seus filhos e filhas. Homens pré-mutados geralmente transmitem apenas a pré-mutação para suas filhas (Eichler, Holden *et al.*, 1994; Crawford *et al.*, 2001; Maddalena *et al.*, 2001).

As características clínicas dos indivíduos portadores da Síndrome do X Frágil são variáveis. Pacientes portadores da zona gray desenvolvem deficiências como distúrbio de aprendizado e comportamento, apesar da mutação relacionada ao número de CGG estar próxima do normal (Mitchell *et al.*, 2004). Distúrbios emocionais, como ansiedade e variação no humor estão associados à pré-mutação em mulheres. O desenvolvimento da falha ovariana precoce (POF) também é uma consequência importante da pré-mutação em pacientes do sexo feminino. Uma síndrome neurodegenerativa, chamada FXTAS (*Fragile X Associated Tremor/Ataxia Syndrome*), foi recentemente descrita e está associada à presença da pré-mutação, e acomete principalmente homens com mais de cinquenta anos. Os principais sintomas clínicos do FXTAS são o tremor e a ataxia (Jacquemont *et al.*, 2003; Hagerman, P. J. e Hagerman, R. J., 2004). Outros estudos relacionaram a presença da pré-mutação em crianças do sexo masculino em fase escolar com o déficit de atenção, a hiperatividade e com a ocorrência de autismo (Cornish *et al.*, 2005; Farzin *et al.*, 2006).

A presença de diversos sinais e sintomas clínicos em pacientes com a SXF, e o risco de transmissão da doença entre gerações, exigem um diagnóstico preciso dos portadores. A confirmação da doença deve ser realizada pelo exame genético laboratorial, pois o diagnóstico clínico é dificultado pela variedade de sintomas e similaridade com outras doenças de comprometimento cognitivo. Uma vez confirmada a Síndrome do X Frágil num indivíduo, deve-se proceder à investigação familiar, caracterizada como o rastreamento de demais portadores da síndrome na família. Isto possibilita o aconselhamento das famílias afetadas sobre os riscos de recorrência da

doença e as possíveis opções reprodutivas. Ainda não existe cura para a Síndrome do X Frágil, mas muitos experimentos terapêuticos e sócio educacionais têm sido realizados com êxito, auxiliando o indivíduo afetado a conquistar um bom convívio familiar, escolar e social (Hagerman e Hagerman, 2002b).

As técnicas mais utilizadas para diagnóstico laboratorial da SXF são a PCR e o Southern blotting, que são fundamentadas na definição do número de repetições de CGG presentes no gene FMR1. Outras metodologias também podem ser exploradas, como a análise cromossômica, a investigação da presença ou ausência da metilação no gene, a quantificação de FMRP e mRNA produzidos em células ou até mesmo o sequenciamento do DNA. Como existem diferentes técnicas e todas apresentam suas vantagens e desvantagens, elas devem ser escolhidas dependendo das características clínicas de cada paciente e seu histórico familiar. O estudo por Southern blotting é confiável no diagnóstico de pacientes do sexo feminino e masculino, porém é laborioso, requer muito tempo de análise, e é de alto custo. Por todas estas desvantagens outros métodos são utilizados como triadores, e o Southern blotting é executado somente em casos concretos de suspeita da síndrome. O teste para triagem inicial de pacientes e familiares sob investigação de síndrome genética deve oferecer precisão, confiabilidade, rapidez e baixo custo. As técnicas de PCR proporcionam estes benefícios, porém apresentam diversas limitações, sendo a principal delas a dificuldade do diagnóstico conclusivo de mulheres normais e de homens e mulheres com pré-mutação (Biancalana *et al.*, 2006). Uma nova técnica de PCR, desenvolvida por Saluto e colaboradores em 2005 e neste trabalho denominada de PCR para Pré-mutação (PCR-P), promete a amplificação de alelos com grandes expansões de repetições de CGG, incluindo a pré-mutação e mutação completa de baixa expansão. A técnica vem propiciar um avanço em pesquisas e diagnóstico laboratorial da Síndrome do X Frágil. Porém, a técnica padrão de PCR descrita por Fu e colaboradores em 1991, aqui denominada de PCR de Triagem (PCR-T), apesar das desvantagens comuns em técnicas de PCR, é amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa e diagnóstico da SXF. Para alteração e inclusão da nova técnica de PCR, a PCR-P, na metodologia aplicada ao diagnóstico da SXF, faz-se necessária a sua avaliação e comparação com a técnica padrão (PCR-T).

O exame para diagnóstico para a SXF é um dos mais solicitados entre os testes de pesquisa de doenças genéticas (Maddalena *et al.*, 2001) e a disponibilidade de uma triagem aprimorada beneficia a todos os pacientes. O rápido e correto diagnóstico aliado

ao estímulo e tratamento precoce têm grande influência no prognóstico dos pacientes portadores. Além disso, o diagnóstico da SXF abrange toda a família, auxilia no aconselhamento genético e diminui os riscos de propagação da doença nas gerações futuras (Steiner *et al.*, 2005).

1.2 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar o desempenho de uma nova técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), descrita por Saluto *et al.* (2005), no diagnóstico laboratorial da Síndrome do X Frágil. Esta nova técnica (PCR-P) promete a amplificação de alelos pré-mutados, o que é um grande avanço quando comparada à técnica de PCR padrão (PCR-T), que amplifica apenas alelos normais e zona gray. Pretende-se verificar as vantagens da nova técnica de PCR (PCR-P), comparada à técnica de PCR de triagem (PCR-T), descrita por (Fu *et al.*, 1991), e avaliar a possibilidade de implementação da PCR-P como exame de escolha em laboratórios de genética molecular humana.

Os objetivos específicos incluem a determinação da eficácia na definição de alelos não detectados pela PCR triadora, principalmente em análises de amostras de pacientes do sexo feminino que, pela PCR utilizada como triagem (PCR-T), geralmente resultam na inconclusividade de diagnóstico. Com os resultados em número de repetições de CGG dos pacientes analisados, espera-se ainda avaliar a frequência alélica da população do Estado de Santa Catarina, já que os sujeitos da pesquisa se concentram neste estado. Finalmente, este trabalho visa propor um plano de triagem no diagnóstico para a SXF, incluindo a nova técnica como elemento de investigação laboratorial da doença. Pretende-se assim proporcionar uma abordagem que assegure maior precisão na definição do diagnóstico.

1.3 Justificativa

Esta pesquisa se insere em uma linha estratégica de estudos do Grupo de Engenharia Genômica da Universidade Federal de Santa Catarina, que pretende contribuir para a investigação das características moleculares da Síndrome do X Frágil. Essa estratégia explora os aspectos multidisciplinares dos mecanismos de regulação, diagnóstico e possibilidades de novas abordagens terapêuticas para pacientes portadores da síndrome e, sobretudo, de indivíduos zona gray e pré-mutados, cujos efeitos

fenotípicos não são facilmente associados à doença genética. Essa população de indivíduos é mais numerosa na população em geral do que os indivíduos afetados e são, freqüentemente, negligenciados em diagnósticos clínicos.

1.4 Estrutura do Documento

Esta dissertação está organizada da seguinte forma: o Capítulo 2 introduz os conceitos fundamentais sobre a Síndrome do X Frágil, suas bases moleculares, principais sintomas clínicos e classificações dos indivíduos portadores, e padrões de herança genética característicos da síndrome. O Capítulo 3 apresenta as principais técnicas utilizadas em diagnóstico laboratorial da SXF, abordando suas aplicações, principais vantagens e desvantagens. No Capítulo 4 estão descritos os procedimentos laboratoriais práticos realizados neste trabalho para o diagnóstico dos pacientes estudados. Também são apresentadas as ferramentas estatísticas para análise dos dados obtidos. Os resultados estão apresentados e discutidos no Capítulo 5 e, finalmente, no Capítulo 6 são resumidas as conclusões e perspectivas da pesquisa.

2. A Síndrome do X Frágil

A SXF é a causa mais comum de retardo mental herdado e a segunda maior causa de retardo mental de origem genética, sendo a primeira a Síndrome de Down. A SXF foi reportada pela primeira vez em 1943 por Martin e Bell em uma família com retardo mental ligado ao cromossomo X (Martin e Bell, 1943). Inicialmente conhecida pelo nome dos autores, Síndrome de Martin-Bell, a SXF foi assim denominada devido à observação de um sítio frágil no cromossomo X. Amostras cultivadas em meios de cultura deficientes em ácido fólico apresentam fragilidade, um sítio frágil na região Xq27.3 do cromossomo. Este foi o primeiro método laboratorial de diagnóstico descrito para a síndrome (Lubs, 1969). Como a SXF é uma doença ligada ao cromossomo X, os sintomas da doença são mais severos em homens do que em mulheres. Indivíduos do sexo masculino afetados pela síndrome normalmente apresentam retardo mental de moderado a grave, que pode ser acompanhado de alterações comportamentais, em especial hiperatividade, movimentos estereotipados, timidez e comportamento autista, ou atraso no desenvolvimento da fala e linguagem. Além dos déficits cognitivos, características físicas também podem estar presentes, como orelhas proeminentes, face alongada e macroquidismo, mas são desenvolvidas apenas na puberdade. Mulheres, quando afetadas pela síndrome, apresentam um retardo mental classificado como leve, dificuldades de aprendizado e distúrbios comportamentais; suas características físicas são variáveis ou ausentes (Hagerman e Hagerman, 2002a).

2.1 O gene FMR1 e a proteína FMRP

As bases moleculares da SXF foram desvendadas no início da década de noventa. O gene envolvido, denominado FMR1 (*Fragile X Mental Retardation 1*), está localizado na região Xq27.3, designada como sítio FRAXA (*fragile site, X chromosome, A site*). O gene FMR1 é altamente conservado e consiste em 17 éxons, de ~38 kb (Verkerk *et al.*, 1991; Ashley, C. T. *et al.*, 1993; Eichler, Richards *et al.*, 1994). O sequenciamento do gene revelou em humanos, um total de 185.775 pares de bases no gene FMR1 (GenBank, número de acesso L29074). A SXF é causada por uma

instabilidade e conseqüente expansão da seqüência de trinucleotídeos CGG, localizada na região 5'UTR (*Untranslated Region*) do gene FMR1 (Figura 1).

Na população normal o número de repetições da seqüência de trinucleotídeos CGG é polimórfico e varia entre 6 e 40, sendo 29 e 30 os alelos mais comuns (Brown *et al.*, 1993; Crawford *et al.*, 2001; Maddalena *et al.*, 2001). Indivíduos afetados pela SXF apresentam expansão de mais de 200 repetições de CGG, caracterizando mutação completa do gene. Esse quadro é comumente acompanhado de metilação na região promotora, resultando na ausência da produção da proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*), produto final do gene. A falta desta proteína é responsável pelo desenvolvimento dos sintomas da SXF (Fu *et al.*, 1991; Verkerk *et al.*, 1991). O mecanismo de silenciamento da transcrição do gene pela metilação das repetições de CGG é causado por desacetilação de histonas. Em células provenientes de indivíduos normais, a região do gene FMR1 que contém as repetições de CGG está associada com histonas acetiladas, mas a acetilação é reduzida em células com a mutação completa metilada (Coffee *et al.*, 1999). Noventa e oito por cento dos casos da SXF são causados pela expansão de CGG; deleções e mutações de ponto no gene FMR1 também podem causar a síndrome, mas são eventos raros (De Boulle *et al.*, 1993; Hammond *et al.*, 1997).



Figura 1. Representação do gene FMR1 e localização das repetições no gene (Fonte: Serpa, 2006. Comunicação pessoal).

A proteína FMRP é amplamente expressa em diferentes tecidos humanos e de camundongo. Testes de hibridização *in situ* revelaram, em tecidos de camundongos adultos, expressão abundante da proteína em cérebro, testículos, ovário, epitélio esofágico, olho e baço; é observada expressão moderada no colo, útero, tireóide e fígado; e ausência da expressão no coração, aorta e músculos (Hinds *et al.*, 1993). Isoformas da proteína FMRP, derivadas do *splicing* alternativo, aparecem em vários tecidos, algumas delas em quantidades variáveis (Ashley, C. T. *et al.*, 1993; Verheij *et*

al., 1995). Análises da sequência de aminoácidos da proteína revelaram a presença de dois tipos de sítios de ligação como o RNA, dois domínios homólogos à ribonucleoproteína K (*KH domains*) e resíduos de agrupamentos de arginina e glicina (*RGG boxes*). Estas características a enquadram como uma proteína de ligação a RNAs, envolvida no controle translacional nas células e atuando localmente em tecido cerebral, nos dendritos, e na regulação da síntese de proteínas (Ashley, C. T., Jr. *et al.*, 1993; Bardoni e Mandel, 2002). Um modelo animal com na SXF, o camundongo FMR1 *knockout*, foi criado e exibiu macroorquidismo, deficiência de aprendizado, memória e hiperatividade, correspondente ao fenótipo humano. Os modelos animais são ferramentas valiosas para estudo e elucidação da atividade fisiológica do gene FMR1, da proteína FMRP e de mecanismos envolvidos no macroorquidismo, distúrbio comportamental e retardo mental (Bakker *et al.*, 1994).

2.1.1 O gene FMR1 em plataformas online

Informações para pesquisadores da área biológica são amplamente divulgadas na Internet. Bancos de dados biológicos e ferramentas de busca estão disponíveis publicamente. O NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi criado em 1988 para desenvolver sistemas de informações para biologia molecular. É uma divisão da NLM (*The National Library of Medicine*), localizado no campus do NIH (*The National Institutes of Health*) em Bethesda, Maryland, Estados Unidos. Nele está inserido o GenBank, que possui sequências de nucleotídeos e anotações biológicas, para o qual a comunidade científica submete dados de suas pesquisas e sequenciamento de nucleotídeos.

O GenBank faz parte do *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* que incorpora também o *DNA DataBank of Japan* (DDBJ), e o *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL). Estas três organizações trocam informações diariamente, o que assegura a atualização e confiabilidade dos dados inseridos e disponíveis online. Ferramentas computacionais para análise de dados disponíveis no GenBank e uma variedade de outros dados biológicos podem ser acessadas na home page do NCBI em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Benson *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 2006). Outra base de dados vinculada ao NCBI é o OMIM, que contém informações textuais de genes humanos e doenças genéticas, além de *links* de referências bibliográficas, *links* para sequências anotadas no sistema e outros assuntos relacionados no NCBI e outras fontes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).

Informações sobre a SXF e o gene FMR1, além de outros dados sobre o seu mRNA e proteína, podem ser encontradas nestas plataformas online. FMR1 é o símbolo adotado para o gene da SXF, reconhecido pelo comitê de nomenclatura HUGO (*HUGO Gene Nomenclature Committee*, <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>). A sequência completa do gene FMR1 pode ser consultada no Genbank sob o número de acesso L29074 e informações textuais na base de dados OMIM sob o número 309550 (Tabela 1).

Tabela 1. Números de acesso a informações do gene FMR1 nas plataformas online GenBank e OMIM.

| Plataforma | Número de acesso |
|------------|------------------|
| GenBank | L29074 |
| OMIM | 309550 |

2.2 Sítios frágeis no cromossomo X

A denominação “Síndrome do X Frágil” é utilizada quando se refere à expansão de CGG no gene FMR1, sítio FRAXA e seu fenótipo característico. Entretanto, outros sítios frágeis presentes no cromossomo X humano já foram descritos: FRAXD, FRAXE e FRAXF. O FRAXE está relacionado a uma mutação no gene FMR2, região Xq28, e contém uma repetição de trinucleotídeos (CCG)_n instável, cuja expansão é responsável pelo fenótipo de retardo mental. O sítio FRAXF que não causa, aparentemente, qualquer fenótipo anormal, também está localizado na região Xq28, onde foi identificada a presença de repetições de GCC; o FRAXD, localizado na região Xq27.2, posição muito próxima ao sítio de retardo mental Xq27.3 (FRAXA), pode estar presente em cariótipo de indivíduos normais. A interpretação da análise citogenética para a SXF pode ser dificultada pela presença destes sítios frágeis localizados em regiões muito próximas no cromossomo X (Ramos *et al.*, 1992; Parrish *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 1997).

2.3 Classificação dos Indivíduos Portadores da SXF

De acordo com o número de repetições de CGG, são essencialmente quatro as classificações alélicas do gene FMR1: normal, zona gray, pré-mutado e afetado (Ver Tabela 2) (Crawford *et al.*, 2001).

O número de repetições da sequência de trinucleotídeos CGG do gene FMR1 é polimórfico e na população normal varia entre 6 e 40. Geralmente existem duas

inserções da trinca AGG nas posições 10 e 20 das repetições de CGG que são cruciais para a estabilidade do gene (Eichler, Holden *et al.*, 1994; Kunst e Warren, 1994; Crawford *et al.*, 2001). Pacientes afetados apresentam mais de 200 repetições de CGG, o que caracteriza a mutação completa do gene e sua subsequente metilação. Consequentemente, o gene fica silenciado e não há produção do mRNA (RNA mensageiro). A ausência do produto do gene FMR1, proteína FMRP, é considerada a causa do retardo mental (Ashley, C. T., Jr. *et al.*, 1993). Pré-mutados apresentam de 61 a 200 repetições de CGG. Esta sequência longa é não metilada e instável quando transmitida entre gerações, estendendo-se de pré-mutação para mutação completa. Setenta por cento dos alelos pré-mutados apresentam uma única inserção de AGG, gerando instabilidade e predisposição para a SXF (Eichler, Holden *et al.*, 1994). Os pacientes chamados zona gray apresentam de 41 a 60 repetições CGG. A designação “zona gray” é dada por se referir a uma faixa intermediária e é pouco associada à transmissão instável entre gerações. Essa é a denominação amplamente aceita no jargão médico. Por isso, esse foi o termo adotado neste trabalho. A instabilidade não é particularidade única do tamanho do alelo. Também está relacionada com características estruturais da sequência CGG como, por exemplo, as inserções de AGG (Sullivan *et al.*, 2002; Nolin *et al.*, 2003).

Tabela 2. Interpretação de resultados de exames de diagnóstico para a SXF em número de repetições de CGG classificados em quatro categorias.

| <i>Número de Repetições de CGG</i> | <i>Classificação</i> |
|------------------------------------|----------------------------|
| 6 a 40 repetições de CGG | Normal |
| 41 a 60 repetições de CGG | Zona Gray |
| 61 a 200 repetições de CGG | Pré-mutação |
| >200 CGG | Afetado (Mutação Completa) |

Obs.: Os limites entre as classificações devem considerar as características clínicas de cada paciente analisado.

Frequentemente pré-mutações são clinicamente definidas quando aparecem com número ≥ 55 repetições CGG (Sherman *et al.*, 2005). As classificações, conforme o número de repetições de CGG, não estão bem estabelecidas e variam dependendo do autor. Por exemplo, Maddalena *et al* (2001) classificam repetições de CGG de 5 a 44 como normal, de 45 a 54 como zona gray, de 55 a 200 como pré-mutado e >200 como mutação completa. Ainda, alguns autores eliminam de suas classificações os indivíduos zona gray, considerando, além da faixa de normalidade, somente pré-mutados e afetados. É importante considerar as características clínicas e o histórico familiar de

cada indivíduo, pois pequenas diferenças, quatro ou cinco repetições de CGG, provavelmente não definem isoladamente a classificação (Hagerman, P. J. e Hagerman, R. J., 2004).

2.4 Prevalência Populacional da SXF

Todos os grupos étnicos parecem ser susceptíveis à expansão de CGG no gene FMR1. A prevalência é similar na maioria dos grupos, mas podem ocorrer variações entre populações. A mutação da SXF afeta 1 em cada 3.600 homens e 1 em 6.000 mulheres (Crawford *et al.*, 2001; Crawford *et al.*, 2002). Os mesmos autores num estudo de prevalência da SXF em homens afro-americanos revelaram um aumento da proporção para 1 em cada 2.545. Aproximadamente 1 em 350 mulheres e 1 em 1000 homens da população caucasiana em geral são portadores da pré-mutação. Um estudo no Canadá revelou a incidência de 1 em 259 mulheres como portadoras de repetições de CGG entre 55 e 101 (Rousseau *et al.*, 1995). Em Israel, amostras de 14.334 mulheres em fase pré-conceptiva ou gestacional, sem histórico familiar de retardo mental, foram analisadas. Os resultados identificaram 1 em 113 mulheres com >54 repetições de CGG e 1 em 69 com >50 repetições de CGG (Toledano-Alhadeff *et al.*, 2001). Este estudo evidenciou a alta prevalência da pré-mutação na população geral e recomenda triagem de mulheres portadoras de pré-mutação em larga escala.

2.5 Características Fenotípicas dos Indivíduos Portadores da SXF

Existe uma grande heterogeneidade fenotípica entre os portadores da SXF. Ela não somente causa retardo mental, mas também dificuldade de aprendizado, problemas emocionais e comportamentais. Além dos sinais e sintomas variados em cada indivíduo, existem diferentes graus de comprometimentos, o que dificulta a definição do diagnóstico clínico.

Os indivíduos afetados apresentam sintomas clínicos severos, incluindo o retardo mental e, em alguns casos, estão associados ao autismo. Distúrbios comportamentais e emocionais também são sintomas marcantes. As características físicas clássicas são orelhas proeminentes, face alongada e macroorquidismo. Aproximadamente 80% dos pacientes com SXF apresentam algumas destas características físicas, mas sua presença varia conforme a idade. Hiperextensibilidade

das articulações, palato alto e pés chatos também podem se manifestar e a hipótese de uma displasia do tecido conectivo na SXF já foi levantada (Hagerman e Hagerman, 2002b). O grau de severidade dos sintomas em pacientes afetados pela síndrome, com mutação completa, não pode ser estabelecido pelo número de repetições de CGG. A presença de ≥ 200 repetições de CGG é acompanhada da metilação gene e, consequentemente da ausência da produção da proteína FMRP, que independem do tamanho da expansão de CGG no gene.

Alguns homens com mutação completa podem apresentar alguns alelos desmetilados, o que é conhecido como mosaicismo para metilação. Estes alelos desmetilados podem produzir a proteína FMRP, embora em pequena quantidade, possivelmente devido a uma ineficiência da transcrição (Feng *et al.*, 1995). Existem também homens mosaicos para pré-mutação e mutação completa. Seus sintomas são menos severos que aqueles pacientes que possuem exclusivamente a mutação completa, que também presenciam níveis de severidade variáveis.

Em mulheres afetadas pela síndrome, a porcentagem de cromossomos X ativos com o número de repetições de CGG normal comparados com os de mutação completa, pode diminuir a severidade dos sintomas, o que é esperado em doenças ligadas ao cromossomo X. Entretanto, é difícil prever a severidade dos sintomas com base nesta atividade do cromossomo. Aproximadamente metade das mulheres com mutação completa são consideradas significativamente afetadas pela SXF (Sherman *et al.*, 2005).

A função cognitiva de pacientes do sexo feminino com pré-mutação é geralmente considerada normal. Porém, dificuldades no aprendizado e no raciocínio matemático já foram relatados para esta população (Lachiewicz *et al.*, 2006). É também comum o aparecimento de distúrbios emocionais, como variação do humor e ansiedade (Hagerman e Hagerman, 2002a). Outra consequência importante em portadoras da SXF é o aumento do risco de falha ovariana precoce (POF), clinicamente definida como a interrupção do ciclo menstrual antes dos 40 anos de idade. Ocorre em 21% das pacientes com pré-mutação para a SXF; na população normal a frequência é de 1%. Aproximadamente 2% e 14% das mulheres com POF isolada e POF familiar, respectivamente, são portadoras da pré-mutação para a SXF (Sherman, 2000), a frequência é alta comparada 0,3% na população geral. A etiologia da falha ovariana e seus riscos associados ainda estão sob investigação (Sherman *et al.*, 2005).

Outra doença genética diretamente associada ao X Frágil é a FXTAS (*Fragile X Associated Tremor/Ataxia Syndrome*). Esta é uma síndrome neurodegenerativa recentemente descrita, que acomete homens com pré-mutação em idade avançada e mulheres com pré-mutação em menor proporção. Estima-se que um terço de homens pré-mutados com mais de cinquenta anos desenvolvam FXTAS. Porém ainda é necessário um estudo de prevalência, pois a doença pode não ser diagnosticada corretamente em adultos com os sintomas característicos (Hagerman, P. J. e Hagerman, R. J., 2004). Os principais sintomas clínicos são ataxia cerebelar e tremor. Outros sintomas descritos incluem deficiências cognitivas, como perda de memória de curto prazo, parkinsonismo, neuropatia periférica, ansiedade, comportamento reclusivo, demência, fraqueza muscular e disfunção do sistema nervoso autônomo (Jacquemont *et al.*, 2003). Estudos em pacientes pré-mutados demonstraram aumento da expressão do mRNA do gene FMR1 e pequena diminuição dos níveis de FMRP em leucócitos. Estes achados podem estar relacionados ao desenvolvimento do FXTAS e POF (Tassone *et al.*, 2000).

Estudos recentes também descrevem a ocorrência de autismo, déficit de atenção e hiperatividade em meninos com pré-mutação, e déficit social cognitivo em adultos. Estes resultados reforçam a necessidade de investigação familiar, principalmente de irmãos, quando diagnosticado um paciente afetado pela SXF. É freqüente que pais não estejam alertas a estes sintomas, principalmente quando já se tem um filho com sintomas graves como os da SXF. O diagnóstico e identificação dos sintomas de crianças com pré-mutação são muito importantes para o tratamento. A maioria das crianças respondem bem a intervenções medicamentosas e o tratamento precoce pode auxiliar na prevenção do desenvolvimento de ansiedade e depressão, também comuns em pacientes pré-mutados de idade avançada (Cornish *et al.*, 2005; Farzin *et al.*, 2006). Pacientes com pré-mutação, que já foram relatados como portadores assintomáticos, não podem mais ser interpretados desta forma.

Pacientes zonas gray estão muito próximos do normal, em termos de mutação, mas podem apresentar algumas deficiências, dificuldade de aprendizado e distúrbio comportamental (Mitchell *et al.*, 2004). Num estudo na Tasmânia, em meninos com necessidade de educação especial, Mitchell *et al.* (2004) relataram que 3,45% destas crianças apresentaram alelos na faixa da zona gray. Também Crawford *et al.* (1999) apresentaram resultado similar: 4,4% de meninos com necessidade de educação especial

apresentaram alelos zona gray, em população de americanos de raça branca. Alguns autores interpretam pacientes zona gray como normais e consideram coincidência quando os alelos zona gray estão associados à dificuldade de aprendizado ou algum atraso no desenvolvimento (Maddalena *et al.*, 2001). Porém, deve-se estar atento à presença da dificuldade de aprendizado; ela pode estar relacionada à SXF e é comumente encontrada em crianças em fase escolar.

2.6 Herança e Padrão de Transmissão do Número de Repetições de CGG

A transmissão da repetição de CGG é estável em indivíduos normais, sem nenhuma ou pouca variação no número de repetições de geração para geração. Em geral, a SXF segue as regras tradicionais de herança de doenças genéticas ligadas ao cromossomo X. Metade dos descendentes de mulheres portadoras de pré-mutação, e todas as filhas e nenhum dos filhos de homens pré-mutados receberão a mutação genética no gene FMR1.

Entretanto, o risco de expansão da repetição de CGG de pré-mutação para mutação completa (>200 repetições CGG) na SXF excede as normas tradicionais. A transmissão da mutação completa de mulheres pré-mutadas para sua prole é diretamente correlacionada ao número de repetições de CGG e está acima de 95% em alelos com mais de 100 repetições de CGG (Heitz *et al.*, 1992; Nolin *et al.*, 2003). Este fenômeno explica o que chamamos de “Sherman Paradox”, que se manifesta clinicamente como o aumento do número e proporção de indivíduos com retardo mental nas sucessivas gerações de famílias portadoras da síndrome (Sherman *et al.*, 1985). O menor tamanho de repetição expandido para mutação completa registrado até agora em uma geração foi o de 59 CGG (Nolin *et al.*, 2003). O risco de expansão de pré-mutação para mutação completa de homens para suas filhas é raro, mas já foi relatado. Tipicamente, o homem pré-mutado passa para suas filhas somente a pré-mutação, com pequenas expansões ou contrações (Zeesman *et al.*, 2004). A maioria dos alelos pré-mutados possuem apenas uma ou nenhuma inserção de AGG. Alelos com repetições de CGG “puras” são menos estáveis que aquelas com inserções de AGG na sequência de bases (Eichler, Holden *et al.*, 1994).

Na zona gray é incomum a instabilidade em transmissões familiares (Oostra and Willemsen 2003). Pequenos aumentos ou diminuições no número de repetições de CGG

podem ocorrer nas transmissões, mas nunca foi observada a expansão do alelo zona gray para a mutação completa em uma geração. Também não é considerado o risco de disfunções associadas à pré-mutação, embora os dados de pesquisa nesta área sejam limitados (Maddalena *et al.*, 2001).

Frequentemente a segregação familiar da mutação no gene FMR1 é identificada a partir de uma criança com mutação completa para a SXF, com quadro clínico de retardo mental ou atraso no desenvolvimento. Uma vez confirmada a mutação completa para SXF, recomenda-se proceder a investigação familiar, o rastreamento de demais portadores da síndrome na família. Como há risco de desenvolvimento tardio de POF e FXTAS, aspectos éticos são relevantes no que diz respeito ao desejo dos familiares de estarem cientes de sua condição de portador da SXF, embora a identificação deles atue na prevenção da transmissão da mutação para gerações futuras. Como os profissionais de saúde, principalmente médicos geneticistas, estão mais bem informados sobre os fenótipos associados à pré-mutação POF e FXTAS, é provável que as famílias possam ser identificadas a partir destes diagnósticos (Sherman *et al.*, 2005).

2.7 Padrão de Mosaicismo em Repetições de CGG e Metilação

As mutações completas do gene FMR1 são instáveis não somente na transmissão entre gerações, mas também nos tecidos de pacientes com SXF (instabilidade somática). Esta instabilidade gera diferentes tamanhos de repetições de CGG num mesmo paciente, o que é chamado de mosaicismo. Esta variação somática é encontrada em ~15% dos pacientes afetados e, na maioria destes indivíduos, ocorre em todos os tecidos. A pré-mutação associada à mutação completa é mais frequentemente encontrada, mas 1% dos indivíduos afetados pela SXF apresentam mosaicismo com alelos de mutação completa e alelos normais (Van Den Ouweland *et al.*, 1994; Maddalena *et al.*, 2001). O nível de metilação do gene mutado também pode variar e também se enquadra no padrão de mosaicismo. Alguns genes de pacientes com mutação completa são parcialmente metilados ou completamente não-metilados (Feng *et al.*, 1995; Jin e Warren, 2000). Essas observações indicam que a expansão da repetição de CGG e a metilação são eventos separados, cuja associação ainda não é muito clara. Os dois eventos descritos influenciam na quantidade de FMRP produzida, que executa papel importante no desenvolvimento cognitivo (Jin e Warren, 2000).

Em resumo, os avanços moleculares para a caracterização da SXF permitiram sua associação com quadros clínicos variáveis, inclusive envolvendo outras doenças, como é o caso do autismo. O papel da FMRP tem se mostrado de importância crucial para o desenvolvimento de funções cognitivas em geral. O correto diagnóstico de indivíduos portadores e seus familiares é, portanto, muito importante não só para a melhor caracterização da doença, mas também para a correta indicação terapêutica. O Capítulo seguinte revisa, em linhas gerais, esses aspectos diagnósticos.

3. Diagnóstico Laboratorial da Síndrome do X Frágil

Como os sinais e sintomas da SXF podem ser semelhantes a outros casos de atrasos e distúrbios gerais de desenvolvimento, é necessária a confirmação do diagnóstico através do exame genético, com técnicas específicas para a síndrome estudada. O exame para o diagnóstico da SXF é um dos mais solicitados entre os testes de pesquisa de doenças genéticas (Maddalena *et al.*, 2001). Como existem diferentes métodos e todas as técnicas apresentam suas vantagens e desvantagens, elas devem ser escolhidas dependendo das características clínicas de cada paciente e seu histórico familiar.

3.1 Técnicas de Diagnóstico para a Síndrome do X Frágil

O genótipo de indivíduos com suspeita clínica, com sintomas característicos da síndrome ou com risco de serem portadores de pré-mutação, pode ser analisado pela determinação do número de repetições dos trinucleotídeos CGG e/ou pela presença ou ausência de metilação no gene FMR1.

Testes que detectam o número de repetições de CGG são >99% sensíveis e resultados positivos são 100% específicos (Maddalena *et al.*, 2001). Para a análise molecular são utilizadas as técnicas: Southern blotting, reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polimerase Chain Reaction*) e PCR específica para metilação (ms-PCR, *methylation specific PCR*). Em certas pesquisas ainda são utilizadas a PCR de transcrição reversa (RT-PCR, *reverse transcripton PCR*) e o Sequenciamento do DNA. Também estão disponíveis a análise cromossômica (exame citogenético, também chamado de Cariótipo) e os testes de imunocitoquímica e imunohistoquímica, que fornecem a porcentagem de proteína FMRP em células.

As principais características técnicas para diagnóstico da Síndrome do X Frágil são apresentadas a seguir e resumidas na Tabela 3 ao final desta seção.

3.1.1 Análise Citogenética

A análise citogenética consiste no estudo numérico e morfológico de cromossomos metafásicos e foi o primeiro método laboratorial de diagnóstico descrito para a SXF (Lubs, 1969). Para realização dessa técnica, também chamada de Cariótipo para a Síndrome do X Frágil, as culturas celulares são incubadas em meios de cultura deficientes em ácido fólico, que induz a fragilidade na região Xq27.3 do cromossomo (sítio frágil). Outros processos, de incubação e bandeamento “G”, permitem a visualização (Figura 2) e classificação dos cromossomos. A análise em microscópio óptico deve abranger no mínimo 50 metáfases em células de pacientes do sexo masculino e 100 metáfases em células de pacientes do sexo feminino, o que requer algumas horas de trabalho especializado. Sabe-se que o método pode falhar na detecção da fragilidade em mulheres e homens afetados pela síndrome, que podem não apresentar a fragilidade no cromossomo X. A presença da pré-mutação ou zona gray não é detectada por esta técnica (Jacky *et al.*, 1991). Devido a insuficiência de especificidade e sensibilidade, este método não é recomendado para o diagnóstico da SXF (Maddalena *et al.*, 2001). A principal vantagem do Cariótipo é a possibilidade de identificação de outras alterações cromossômicas morfológicas ou numéricas, comumente encontradas em indivíduos com retardo mental e outros distúrbios cognitivos (Jacky *et al.*, 1991).

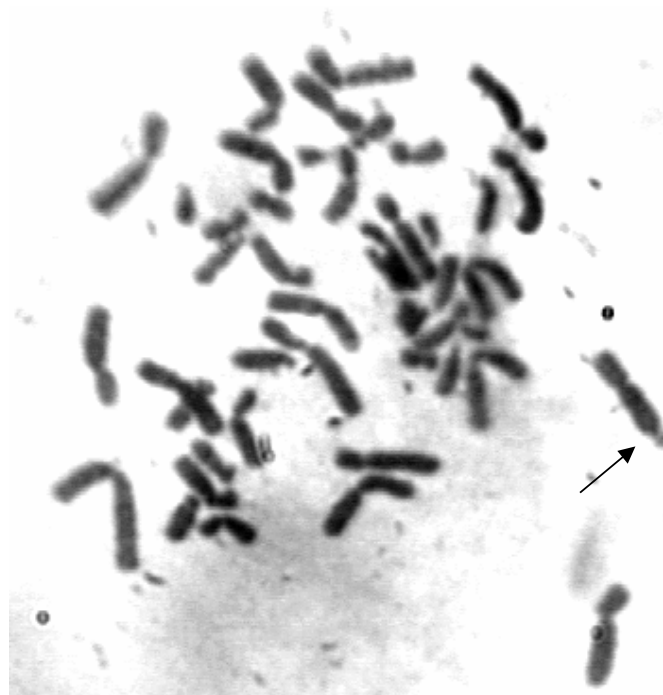


Figura 2. Visualização do sítio frágil no cromossomo X, região Xq27.3 (seta), em Cariótipo (Fonte: Laboratório Neurogene, 2006. Comunicação pessoal).

3.1.2 PCR e Southern Blotting

As ferramentas moleculares são as mais utilizadas para diagnóstico da SXF. O teste de triagem é a PCR, que confirma a sua preferência pela facilidade e rapidez no diagnóstico. É realizada a partir de iniciadores, seqüências de DNA que flanqueiam uma região do gene, específicos para amplificação da região de interesse do gene FMR1.

A técnica de PCR é um método *in vitro* que permite a amplificação de seqüências específicas de DNA. A mistura padrão de PCR contém: a amostra de DNA a ser estudada, um par de iniciadores, a enzima termoestável *Taq* DNA Polimerase, e quatro desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) em uma solução tampão. Os pares de iniciadores utilizados devem ser complementares às extremidades da seqüência de DNA de interesse. A primeira etapa da reação de PCR é o aquecimento para desnaturação da dupla fita de DNA, seguida da ligação dos iniciadores (*annealing* ou “anelamento”) nos locais complementares específicos e da extensão do DNA pela enzima. Cada série de desnaturação, anelamento e extensão, que ocorrem em diferentes temperaturas, é chamada ciclo. As seqüências de DNA de interesse são produzidas exponencialmente, pois os produtos formados a cada ciclo são utilizados pelos iniciadores na produção de novas seqüências do DNA alvo no ciclo seguinte (Rose, 1991).

Várias condições de PCR, pares de iniciadores e métodos de separação e detecção dos alelos já foram descritos para diagnóstico laboratorial da SXF. Teoricamente, todas as reações de PCR, para pesquisa de qualquer loco, podem falhar na detecção de um alelo se existir um polimorfismo no local de anelamento do iniciador. Porém, não há qualquer polimorfismo conhecido que afete os iniciadores comumente utilizados no diagnóstico da SXF (Maddalena *et al.*, 2001; Oostra e Willemsen, 2001).

Dependendo do número de repetições de CGG presente no gene, os produtos da reação de PCR apresentam diferentes tamanhos, o que é indicativo do número de repetições de CGG presente no alelo de cada indivíduo testado. Regiões ricas em citosina e guanina são de difícil amplificação e condições especiais são necessárias. Nestas regiões há a formação de estruturas secundárias, *hairpins*, reconhecidas pela DNA polimerase como sítios de pausa, ocorrendo amplificações incompletas e resultando em produtos da PCR com múltiplas bandas. A utilização de 7-deaza-2'-deoxiguanosina trifosfato (7-deaza-dGTP), DMSO (dimetilsulfóxido) e betaína diminuem a formação de estruturas secundárias e aliviam estas pausas (Innis M A,

1990; Henke *et al.*, 1997). A eficiência da reação de PCR na SXF é inversamente proporcional ao número de repetições de CGG. Quanto maior a mutação (expansão do gene) menor a confiabilidade da amplificação pela técnica. As análises por PCR têm baixa sensibilidade na detecção de alelos com pré-mutação e mutação completa. Algumas técnicas de PCR se empenham na definição destes alelos, mas normalmente incluem etapa de hibridização previamente à visualização final do resultado, o que encarece, dificulta e aumenta o tempo de análise. Além disso, não é possível identificar a diferença entre pacientes do sexo feminino homozigotas com alelos normais e aquelas com um alelo normal e um segundo alelo pré-mutado, não amplificável, sendo os resultados, portanto, inconclusivos. Um por cento dos indivíduos afetados pela SXF apresentam mosaicismo com alelos de mutação completa e alelos normais, estes amplificáveis em testes PCR, o que pode gerar um resultado falso positivo (Maddalena *et al.*, 2001).

Foi descrita recentemente, por Saluto *et al.*, em 2005, a técnica de *Enhanced* PCR que resulta num diagnóstico conclusivo para pacientes do sexo feminino com até ~160 repetições CGG, e pacientes do sexo masculino com até ~330 repetições CGG. Além da amplificação de alelos pré-mutados em mulheres e mutados de baixa expansão em homens, outra vantagem desta nova técnica é a utilização de uma reação de PCR simples com visualização direta dos resultados em gel de agarose, sendo desnecessário o emprego da hibridização e material radioativo.

A análise do gene FMR1 por Southern blotting é também baseada na identificação do número de repetições de CGG do gene FMR1. O teste combina o uso de enzima de restrição, *EcoRI*, com sonda de CGG_n, sonda StB12.3 ou sonda equivalente, que permite a identificação de alelos em todas as faixas, incluindo os pré-mutados de grande expansão e os com mutação completa do gene FMR1 (Rousseau *et al.*, 1991). Os fragmentos de DNA resultantes da digestão enzimática são submetidos à corrida de eletroforese em gel de agarose juntamente com um marcador de peso molecular conhecido. O DNA é transferido para membrana de nylon e hibridizado com a sonda marcada com material radioativo ou quimioluminescente, conforme descrito recentemente por (Gold *et al.*, 2000), evitando a manipulação de material radioativo em laboratórios.

A técnica informa se o paciente é afetado ou não e pode detectar todos os tamanhos de expansão de CGG, mas não fornece o número exato das repetições, o que

dificulta a diferenciação entre pacientes zona gray e pré-mutados de baixa expansão. Esta dificuldade se acentua no diagnóstico de mulheres. O grau de separação entre dois alelos de tamanho normal pode ser idêntico ao de um alelo normal e outro zona-gray ou pré-mutado de baixa expansão. A técnica também identifica a presença ou ausência da metilação no gene. Quando utilizada enzima de restrição sensível à metilação, como a *EagI* ou *NruI*, há falha no corte do DNA metilado, o que diferencia alelos metilados e não metilados. É um exame de alto custo, laborioso, que requer grande quantidade de DNA genômico purificado e, que em alguns protocolos, exige a manipulação de material radioativo. Consequentemente, seu uso é inconveniente como diagnóstico de rotina, especialmente como teste de triagem (Oostra e Willemsen, 2001; Biancalana *et al.*, 2006).

A combinação de métodos de PCR e Southern blotting para o diagnóstico conclusivo da Síndrome do X Frágil é confiável, mas muitas vezes inviável pelo longo tempo de análise necessário para definição do diagnóstico. Muitos laboratórios utilizam a PCR como triadora, e recorrem ao Southern blotting somente em amostras de pacientes do sexo masculino que falham na amplificação do alelo ou naquelas de pacientes do sexo feminino que apresentam um único alelo normal.

3.1.3 PCR para Pesquisa da Metilação

Os testes moleculares de pesquisa da metilação no gene FMR1 são baseados na análise do DNA genômico modificado por tratamento com bissulfito e posterior análise eletroforética para definição de presença ou ausência de metilação na sequência alvo estudada. O tratamento do DNA com bissulfito converte as repetições de trinucleotídeos de gene FMR1 não-metiladas de 100% G:C pares de bases (5'- CCG -3', fita complementar) para 33% G:C (5'- TTG -3') e o DNA metilado, convertido a ~67% G:C (5'- TCG -3'). Este tratamento, além de permitir a diferenciação entre alelos metilados e não metilados, reduz a dificuldade de amplificação da repetição de CGG por PCR. Apesar disso, grandes expansões de CGG ainda são obstáculos para amplificação e detecção, mesmo após tratamento com bissulfito, especialmente em mulheres, pois há a amplificação preferencial do alelo existente na faixa da normalidade (Zhou *et al.*, 2004).

Zhou *et al.*, em 2004, descreveram técnica de ms-PCR (*methylation specific PCR*, PCR específica para metilação), que além de diferenciar sequências metiladas de não metiladas, define a presença de alelos normais, pré-mutados ou com mutação completa em indivíduos do sexo masculino e feminino. A técnica aplica um triplo PCR,

inicialmente com uma reação de PCR que detecta os alelos não-metilados normais e pré-mutados, seguido de duas reações de PCR utilizadas na classificação dos alelos metilados, normais, pré-mutados e com mutação completa visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio. No diagnóstico por metilação em indivíduos do sexo feminino, é esperada a visualização de alelo na faixa da normalidade metilado, referente ao cromossomo X inativado.

Outra técnica de ms-PCR, baseada na análise por fluorescência do produto da PCR específico para metilação, foi descrita em 2006. Realiza-se a reação de PCR com iniciadores marcados com fluorescência, complementares à sequência de DNA, modificada pelo tratamento com bissulfito, metilada e não-metilada. Os produtos da PCR são submetidos à eletroforese capilar e as mutações do gene FMR1 determinadas por uma combinação de análise de picos de fluorescência e eletroferograma analisados pelo software GeneScan®. Alelos normais, pré-mutados e com mutação completa apresentam diferentes padrões de picos no resultado do GeneScan eletroferograma, permitindo a identificação e diferenciação de cada tipo de alelo para o diagnóstico final (Zhou *et al.*, 2006).

A ms-PCR para diagnóstico da SXF pode ser um método alternativo ou complementar do estudo por Southern blotting. Apesar de ser um método confiável, a ms-PCR exige a utilização de materiais e equipamentos de alto custo e de muito tempo para finalização da análise, dificultando a sua utilização como método de triagem.

3.1.4 PCR de Transcrição Reversa

Uma técnica para análise quantitativa da transcrição reversa do mRNA por fluorescência (RT-PCR, *reverse transcription PCR*, PCR de transcrição reversa) pode ser empregada em pesquisas de expressão gênica. O método de PCR de transcrição reversa quantitativo-fluorescente é preciso e confiável. Emprega sonda de hibridização fluorogênica e detecta fluorescência em tempo real. Durante os ciclos da PCR, a intensidade da fluorescência é captada e o número de cópias do mRNA determinado quantitativamente (Heid *et al.*, 1996). Sabe-se que a expressão de mRNA em leucócitos de indivíduos portadores da pré-mutação é maior que em indivíduos normais. Este aumento foi observado naqueles com repetições de CGG entre 100 e 200 (Tassone *et al.*, 2000). O método é empregado apenas em pesquisas, pois não define o diagnóstico e a classificação dos pacientes. A expressão do gene FMR1 segue um mesmo padrão em indivíduos normais, zona gray e pré-mutados com expansão até 100 repetições de CGG.

3.1.5 Sequenciamento do DNA

Métodos automáticos para sequenciamento da região das repetições de CGG também podem ser aplicados para diagnóstico da síndrome. Em uma minoria de indivíduos com SXF, outros mecanismos que não a expansão de CGG, como deleções ou mutações de ponto, são responsáveis pelas manifestações da doença. Nestes casos são indicados estudos específicos, como o sequenciamento do gene FMR1 ou regiões do gene. (Sherman *et al.*, 2005). Porém, a técnica é mais utilizada em pesquisa, devido ao alto custo de equipamento e material de consumo.

3.1.6 Teste de Imunocitoquímica

O ensaio de imunocitoquímica, descrito por Willemsen em 1995, informa o percentual de FMRP em linfócitos das amostras de sangue analisadas. O teste é realizado em três etapas de imunoincubação: anticorpo monoclonal contra FMRP, biotina, e pelo complexo estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina. Os linfócitos são visualizados em microscópio óptico e determina-se o percentual através do número de linfócitos positivos, que apresentam coloração avermelhada (Figura 3). Pacientes afetados possuem de 0 a 15% de FMRP, enquanto pessoas normais apresentam de 80 a 100%. A técnica é eficaz no diagnóstico de pacientes afetados do sexo masculino (Willemsen *et al.*, 1995; Willemsen *et al.*, 1997). O método requer sangue fresco, o que pode ser uma das principais limitações para o uso rotineiro em laboratórios de diagnóstico. É utilizado em análises de larga escala, pesquisas, ou em casos de difícil diagnóstico, por exemplo em pacientes de clínica sugestiva, mas com alelo normal amplificado por PCR.

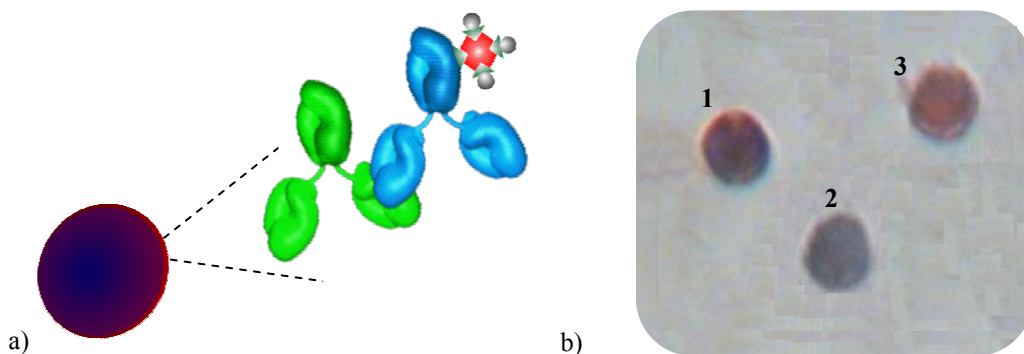


Figura 3. Esquema representativo da técnica de Imunocitoquímica. a) representação de linfócito positivo para FMRP. b) visualização de células em microscópio óptico. 1. linfócito positivo (halo vermelho), 2. linfócito negativo e 3. outra célula (Fonte: Serpa, 2006. Comunicação pessoal).

3.1.7 *Teste de Imunohistoquímica*

O teste de pesquisa que detecta a presença ou ausência da proteína FMRP também pode ser utilizado como um método alternativo no diagnóstico pré-natal, em amostras de vilo corial, na indicação de mutação completa em fetos do sexo masculino. O método não é recomendado no diagnóstico pré-natal de fetos do sexo feminino, caso em que a mesma amostra do vilo corial destes fetos podem se apresentar em um momento como completamente positiva e, em outro, negativa. Os autores atribuem este fenômeno à inativação do cromossomo X em células de fetos do sexo feminino (Willemsen *et al.*, 2002).

Tabela 3. Finalidade, vantagens e desvantagens dos métodos de diagnóstico da SXF.

| <i>Método</i> | <i>Pesquisa de:</i> | <i>Vantagens</i> | <i>Desvantagens</i> |
|-------------------|--|--|--|
| Cariótipo | Fragilidade loco FRAXA, cromossomo X | Identificação de anomalias cromossômicas | Longo tempo de análise Risco de falso negativo Não diferencia FRAXA de FRAXE Não detecta pré-mutação e zona gray Não detecta mutações de ponto |
| PCR | Número de repetições de CGG no gene FMR1 | Rapidez Sensibilidade Pouco DNA Precisão no número de CGG Detecção de zona gray e pré-mutação* (♂ e ♀) | Risco de resultado inconclusivo Não detecta mutações de ponto |
| Southern blotting | Número de repetições de CGG no gene FMR1 | Confiável para homens e mulheres | Longo tempo de análise Muito DNA Manipulação de radioativo Não detecta mutações de ponto Alto custo |
| Sequenciamento | Seqüência de DNA do gene FMR1 | Identifica mutações de ponto Confiável para homens e mulheres | Alto custo |
| ms-PCR | Metilação no gene FMR1 | Diagnóstico de afetados (♂ e ♀) Exame alternativo ou complementar ao Southern blotting | Não detecta mutações de ponto Longo tempo de análise Alto custo |
| RT-PCR | mRNA produzido pelo gene FMR1 | Estudo de expressão gênica | Pouco utilizada para diagnóstico |
| Imunocitoquímica | FMRP em células | Diagnóstico de afetados | Confiável apenas para homens Necessidade de amostra fresca |
| Imunohistoquímica | FMRP em tecidos | Diagnóstico pré-natal | Confiável apenas para homens Necessidade de amostra fresca |

*Pré-mutação não evidenciada por todas as técnicas de PCR.

3.2 Indivíduos que Devem Ser Testados para a Síndrome do X Frágil

Devem ser submetidos a testes para pesquisa de mutação no gene FMR1, loco FRAXA, todos os indivíduos de ambos os sexos que tenham retardo mental, atraso no desenvolvimento, ou autismo. Principalmente se esses sintomas forem acompanhados de qualquer característica física ou comportamental da SXF, ou que possuem familiares com retardo mental não diagnosticado ou histórico familiar para a SXF. Também devem ser testados os indivíduos com familiares diagnosticados como portadores da SXF. Nestes casos é recomendado o aconselhamento genético e avaliação do risco de também serem portadores da síndrome e possível transmissão para futuras gerações (Sherman *et al.*, 2005). Se uma mulher tem falha ovariana precoce (POF), o teste de DNA para avaliação da pré-mutação no gene FMR1 deve ser considerado como parte da avaliação da infertilidade e previamente à fertilização *in vitro*. Também devem estar sob investigação da pré-mutação aqueles pacientes, principalmente homens, com tremor e ataxia, para descartar a possibilidade do FXTAS.

A SXF pode estar presente em 0,8% dos indivíduos com autismo, 0,5% em crianças em fase escolar com atraso na fala, 0,56% de indivíduos com retardo mental e 0,9% daqueles com retardo mental não-específico. Estas frequências podem parecer baixas para justificar uma análise laboratorial para pesquisa da SXF nestes pacientes. Entretanto, é importante salientar que estas condições são muito comuns na população em geral e um estímulo precoce tem grande influência no prognóstico dos pacientes. Além disso, o diagnóstico da SXF abrange toda a família, e pode ser realizada a pesquisa dos demais familiares para auxiliar no aconselhamento genético e diminuir os riscos de propagação da doença nas gerações futuras (Steiner *et al.*, 2005).

3.3 Aconselhamento Genético e Tratamento da Síndrome do X Frágil

Pacientes quando não propriamente diagnosticados são muitas vezes submetidos a tratamentos inadequados, agravando ainda mais o quadro clínico. Uma vez realizado o diagnóstico laboratorial de um paciente e detectada a presença da mutação, é importante o aconselhamento genético familiar e a continuidade da investigação molecular nos demais membros da família. É muito importante lembrar que muitas vezes pacientes com pré-mutação e zona gray podem não apresentar sintomas, ou podem estes não estar claramente relacionados com uma síndrome genética, por exemplo a POF. Pediatras e

professores estão diretamente envolvidos no diagnóstico, tratamento e decisões educacionais de crianças com a SXF. É fundamental a divulgação no meio médico e escolar. A informação pode melhorar o direcionamento do tratamento e estímulo educacional de cada criança (Lee *et al.*, 2005).

Embora existam inúmeras técnicas moleculares atualmente disponíveis para o diagnóstico da SXF, há ainda a necessidade de ter em um procedimento um resultado que seja ao mesmo tempo confiável e de baixo custo. A técnica de *Enhanced* PCR é, portanto, uma boa alternativa a ser considerada, tendo em vista a ampla disseminação dos métodos de PCR e por melhorar significativamente a confiabilidade dos resultados, conforme será demonstrado no Capítulo 5 (Resultados e Discussão). O Capítulo 4, a seguir, detalha os procedimentos das técnicas de PCR utilizadas neste trabalho, bem como os outros procedimentos adotados para a coleta e tratamento das amostras.

4. Materiais e Métodos

Neste capítulo estão descritos os procedimentos laboratoriais e técnicas utilizadas no diagnóstico da SXF dos sujeitos da pesquisa (122 indivíduos: 100 do sexo feminino e 22 do sexo masculino). As etapas práticas da pesquisa foram realizadas no Neurogene Laboratório, Florianópolis, SC, que disponibilizou equipamentos e espaço físico para o desenvolvimento desta pesquisa. Também estão apresentados os métodos de análise estatística utilizados para verificação de validação do estudo.

Para realização deste trabalho, o projeto de pesquisa de mestrado foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina e aprovado sob o número 120/06. Os sujeitos da pesquisa foram selecionados ao acaso, de grupo um de pacientes avaliados clinicamente, e encaminhados ao Laboratório Neurogene nos anos de 2005 e 2006 para estudo molecular da Síndrome do X Frágil. Todos os participantes foram informados sobre benefícios e riscos da participação nesta pesquisa, verbalmente e por escrito, pelo termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) que foi assinado pelos próprios participantes ou responsáveis. Foram também analisados na pesquisa os registros de dados dos pacientes referentes à idade, sexo, procedência e indicação clínica.

O número de repetições de trinucleotídeos (CGG) foi determinado a partir do DNA genômico por duas técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): PCR de Triagem (PCR-T), de acordo com Fu e colaboradores (1991), e PCR para Pré-mutação (PCR-P), de acordo com Saluto e colaboradores (2005). Para comparação e avaliação da eficiência dos métodos de PCR de Triagem e PCR para Pré-mutação, foram analisados os resultados dos procedimentos de PCR das 122 amostras de DNA genômico, provenientes de pacientes com indicação clínica para a Síndrome do X Frágil. Um paciente do sexo masculino foi também avaliado pela análise citogenética, devido a suspeita de ser portador da Síndrome de Klinefelter, e outros seis pacientes (cinco do sexo feminino e um do sexo masculino) analisados também pela técnica de Southern blotting, por indicação médica.

4.1 Amostragem

Foram analisadas amostras de sangue provenientes de 122 indivíduos, sendo 100 do sexo feminino e 22 do sexo masculino, com indicação clínica para a SXF. Nas indicações clínicas estão presentes a suspeita clínica da SXF e/ou o histórico familiar da síndrome.

As características mais comuns nos pacientes analisados com suspeita clínica foram: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM), hiperatividade, déficit de atenção, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDA-H), déficit de aprendizagem, retardo mental, atraso da fala e linguagem e distúrbio de comportamento.

Dentre os indivíduos com histórico familiar para a síndrome alguns apresentaram características clínicas da doença, outros não; alguns indivíduos apresentavam histórico familiar de retardo mental ligado ao cromossomo X; outros foram analisados por necessidade de investigação familiar da SXF.

4.2 Extração do DNA Genômico

O material biológico (sangue) dos pacientes foi coletado em tubos com anticoagulante EDTA. O DNA genômico foi extraído de 300 µl do sangue total conforme protocolo do kit de extração de DNA Puregene DNA Blood Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). O DNA foi quantificado por comparação visual ao marcador de peso molecular conhecido (500 µg Lambda DNA, Invitrogen Life Technologies, Carisbald, CA, USA) em diferentes concentrações, diluído nas concentrações finais de 10 e 20 ng/µl e estocado à temperatura de -20°C para posterior utilização nas técnicas de PCR.

4.3 Protocolo da Técnica de PCR de Triagem (PCR-T)

A técnica de PCR para pesquisa da SXF foi descrita em 1991, por Fu et al, e é amplamente utilizada em laboratórios de genética molecular humana como triagem inicial para o diagnóstico da síndrome. O método é nesta dissertação denominado de PCR de Triagem (PCR-T). Neste trabalho, a técnica foi utilizada com adaptações, sendo a principal delas a substituição de um dos iniciadores sugeridos pelo autor, o iniciador F, pelo iniciador 2, de Pergolizzi e colaboradores (1992). O anelamento dos iniciadores F e 2 ocorre em posições muito próximas no gene, sobrepostas em algumas bases (Ver Figura 4) e os produtos finais da PCR diferem em apenas 23 pares de bases. Esta substituição foi

considerada confiável e, portanto, não prejudicial às avaliações de diagnóstico dos pacientes. A substituição de iniciadores é o protocolo regular seguido no Laboratório Neurogene na realização do diagnóstico de triagem da SXF, que foi implantado devido à confiabilidade dos resultados obtidos e disponibilidade dos materiais. Outra adaptação foi a visualização de resultados diretamente em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, excluindo a etapa de hibridização do gel que faz uso de material radioativo ou quimioluminescente, o que torna o método laborioso e de alto custo, dificultando sua utilização como método de triagem.

Iniciador C e Iniciador F

```

5'
13621 gagcccgcg ggggagggaa cagcgttgat cacgtgacgt ggtttcagtg tttaacaccg
13681 cagcgggccc ggggttcggc ctcaagtcagg cgctcagctc cgtttcgggtt tcacttcogg
13741 tggaagggccg cctctgagcg ggcggcgggc cgacggcgag cgcgggcggc ggcgggtgacg
13801 gaggcgccgc tgccaggggg cgtgcggcag cgcgggcgcg gcggcgggcg cggcggcggc
13861 ggagggcgcg gcggcgggcg cggcggcggc ggctgggcct cgagcgccc cagcccacct
13921 ctcgggggcg ggctcccggc gctagcagg ctgaagagaa gatggaaggag ctggtggtgg
13981 aagtgcgggg ctccaatggc gctttctaca aggtacttgg ctctagggca ggccccatct
14041 tcgcccttcc ttccctccct tttcttcttg gtgtcggcgg gaggcaggcc cggggccctc
3'

```

Iniciador C e Iniciador 2

```

5'
13621 gagcccgcg ggggagggaa cagcgttgat cacgtgacgt ggtttcagtg tttaacaccg
13681 cagcgggccc ggggttcggc ctcaagtcagg cgctcagctc cgtttcgggtt tcacttcogg
13741 tggaagggccg cctctgagcg ggcggcgggc cgacggcgag cgcgggcggc ggcgggtgacg
13801 gaggcgccgc tgccaggggg cgtgcggcag cgcgggcgcg gcggcgggcg cggcggcggc
13861 ggagggcgcg gcggcgggcg cggcggcggc ggctgggcct cgagcgccc cagcccacct
13921 ctcgggggcg ggctcccggc gctagcaggg ctgaagagaa gatggaggag ctggtggtgg
13981 aagtgcgggg ctccaatggc gctttctaca aggtacttgg ctctagggca ggccccatct
14041 tcgcccttcc ttccctccct tttcttcttg gtgtcggcgg gaggcaggcc cggggccctc
3'

```

Figura 4. Local de anelamento dos iniciadores C, F e 2 no gene FMR1, em negrito, e repetições de cgg, em itálico sublinhado.

Nos procedimentos das reações PCR foram utilizados dois controles: o negativo e o branco. O controle negativo é realizado a partir de uma amostra de DNA de paciente normal para a Síndrome do X Frágil, portanto com alelo amplificável, e garante que as reações desenvolvidas procederam com sucesso. O controle branco é realizado na ausência de DNA e deve resultar na ausência de ampliações. Este controle garante que as

amplificações ocorridas durante a PCR são específicas para a Síndrome do X Frágil e estão livres de qualquer contaminação.

4.3.1 Amplificação da Sequência Alvo por PCR-T

A amplificação da sequência de interesse do gene FMR1 ocorreu em reação de volume total de 15 µl, contendo 0,4 µM do iniciador C (5'gctcagctccggtttcggtttcacttccggt 3'), 0,4 µM do iniciador 2 (5'tcctccatcttctcttcagccct 3'), 300 µM de dNTPs, 150 µM 7-deaza-dGTP, 1 U da enzima Taq DNA Polimerase (CENBIOT-Enzimas, Centro de Biotecnologia, UFRGS), 10% DMSO, 1,30 µl de tampão 10X fornecido pelo fabricante da enzima, 2,5 mM de MgCl₂ e 50 ng de DNA genômico. Esta solução foi submetida a ciclos de temperatura, em termociclador (MiniCycler MJ Research, Watertown, MA, USA). Inicialmente ocorreu a desnaturação a 92°C por 3 min, seguida de 30 ciclos a 97°C por 30 segundos (desnaturação), 61°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão) e finalizada com extensão a 72°C por 5 minutos. O tamanho final esperado de cada produto da PCR é de 198 pares de bases (excluindo as repetições de CGG). A sequência dos iniciadores está apresentada na Tabela 4 e os seus locais de anelamento no gene FMR1 representado na Figura 4.

Tabela 4. Iniciadores utilizados na amplificação dos alelos do gene FMR1 pelas técnicas de PCR-T e PCR-P.

| <i>Técnica</i> | <i>Iniciador</i> | <i>Sequência 5'→ 3'</i> | <i>Identificação do Nucleotídeo no GenBank</i> | <i>Tamanho do Produto Amplificado</i> |
|----------------|------------------|---------------------------------|--|---------------------------------------|
| PCR-T | C | gctcagctccggtttcggtttcacttccggt | 13.711 – 13.741 | 198 + 3n |
| | 2 | tcctccatcttctcttcagccct | 13.946 – 13.969 | |
| PCR-P | C | gctcagctccggtttcggtttcacttccggt | 13.711 – 13.741 | 221 + 3n |
| | F | agccccgcacttccaccaccagctcctcca | 13.963 – 13.992 | |

n = número de trinucleotídeos (CGG).

4.3.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a seguinte mistura: 7,5 µl do produto da PCR, juntamente com 3 µl do tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% e glicerol 30%). O gel foi preparado com 3,7 ml de água, 1,0 ml de bisacrilamida 31 %, 1,20 ml de TBE (tris, ácido bórico e EDTA) 5X, 3,75 µl de Temed (Invitrogen Life Technologies, Carisbald, CA, USA) e 75 µl de persulfato de amônio 10%, aplicado entre placas de vidro de 10 cm por 7 cm, previamente limpas, e

permitida à polimerização a temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos. A eletroforese ocorreu a 100 V por aproximadamente 60 minutos em aparato vertical de eletroforese (Mini - V 8.10, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA), contendo tampão TBE 1X. No gel também é acrescido um marcador de peso molecular conhecido para posterior comparação do tamanho do fragmento analisado.

4.3.3 Visualização dos Produtos da PCR e Determinação do Número de Repetições de CGG

Após o procedimento de eletroforese, o gel de poliacrilamida é corado com nitrato de prata para visualização dos resultados. São utilizadas as soluções de ácido acético 10%, solução de coloração, contendo nitrato de prata e formaldeído 37% e a solução de revelação, com carbonato de sódio, tiosulfato de sódio e formaldeído 37%. Esta coloração permite a visualização permanente dos fragmentos revelados, desde que o gel seja armazenado em local seco e manipulado com cuidado.

O tamanho dos fragmentos obtidos, chamados de bandas, foi determinado utilizando como referência o marcador de peso molecular de 50 pares de bases (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Com o tamanho do fragmento em pares de bases é possível calcular o valor aproximado do número de repetições de CGG presente em cada amostra analisada. Para tanto se subtrai o valor esperado do produto da amplificação sem a repetição do trinucleotídeo CGG (198 pares de bases), que se refere à soma do número de bases de cada iniciador (Iniciador C e Iniciador 2) e o número de bases que flanqueiam a região de repetições de CGG do gene FMR1 (Figura 4).

O diagnóstico é definido pelo número de repetições de CGG, que enquadra o paciente em uma das categorias de classificação da SXF: normal, zona gray, pré-mutado ou afetado. Há a possibilidade de o diagnóstico ser inconclusivo quando mulheres apresentarem somente um fragmento amplificado ou homens não apresentarem qualquer fragmento amplificado, sendo neste caso além de inconclusivo, sugestivo da presença da mutação completa, ou seja, de que o paciente é afetado pela síndrome. A Figura 5 mostra um esquema representativo da visualização dos produtos de PCR-T e PCR-P nos géis de poliacrilamida e agarose.

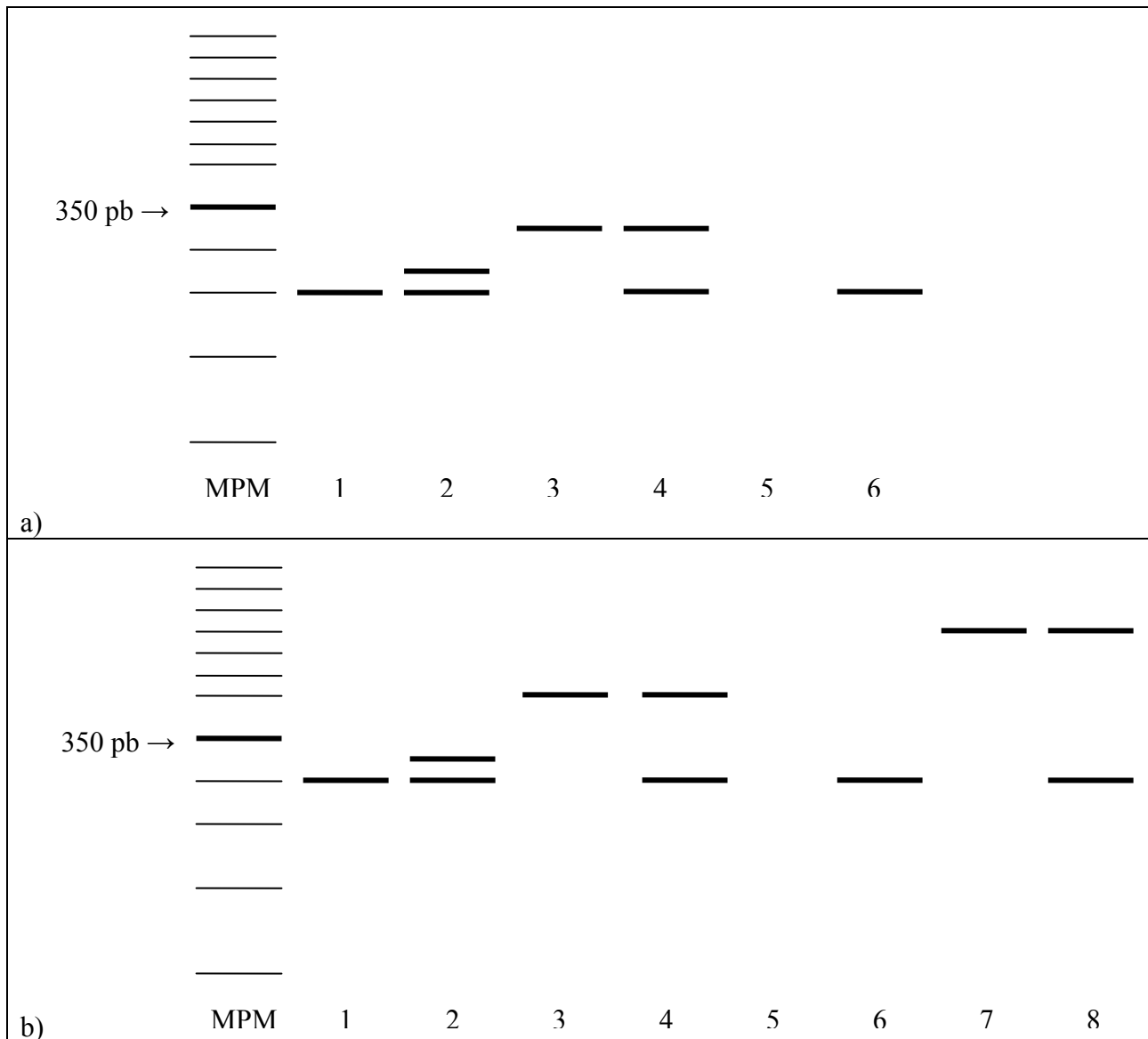


Figura 5. a) Representação da visualização dos produtos de PCR-T em gel de poliacrilamida. b) Representação da visualização dos produtos da PCR-P em gel de agarose. Resultados de pacientes normais do sexo masculino estão representados nas fileiras 1, zona gray nas fileiras 3, inconclusivo nas fileiras 5, e pré-mutação na fileira 7. Resultados de pacientes normais do sexo feminino estão representados nas fileiras 2, zona gray nas fileiras 4, inconclusivo nas fileiras 6, e pré-mutação na fileira 8. “MPM” se refere a marcador de peso molecular e “pb” a pares de bases.

4.4 Protocolo da Técnica de *Enhanced* PCR ou PCR para Pré-mutação (PCR-P)

A *Enhanced* PCR, descrita por Saluto *et al.*, em 2005, foi selecionada para utilização nesta pesquisa devido ao seu compromisso de amplificação de fragmentos de até

~330 repetições de CGG (mutação completa de baixa expansão) em pacientes do sexo masculino e fragmentos de até ~160 CGG (pré-mutação) no sexo feminino. Esses resultados são considerados muito satisfatórios para técnicas de PCR no diagnóstico da SXF. Por estas considerações, a técnica foi neste trabalho denominada de PCR para Pré-mutação (PCR-P).

4.4.1 Amplificação da Sequência Alvo por PCR

As reações de PCR foram conduzidas com os iniciadores C (5'getcagctccgttttcggtttcacttcggt 3') e F (5'agccccgcacttcaccaccagctctcca 3') (Fu *et al.*, 1991). O volume total da reação foi de 30 µl, contendo os produtos do kit Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), utilizado o tampão 2 e 1 U da enzima, 500 µM dNTPs, 2,0 M de betaína (Betaine B0300, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,33 µM de cada iniciador e 20 ng de DNA genômico. A adição de 7-deaza-dGTP ou combinação de 7-deaza-dGTP e betaína ao *mix* da reação não são indicadas nesta técnica, pois não melhoram a amplificação e pode levar a ausência total de produto de PCR (Saluto *et al.*, 2005). As reações seguiram os ciclos de temperatura a seguir: desnaturação a 98°C por 10 minutos (conforme sugerido pelo fabricante Roche Diagnostics, Mannheim, Germany); 10 ciclos a 97°C por 35 segundos (desnaturação), 64°C por 35 segundos (anelamento), 68°C por 4 minutos (extensão); 25 ciclos a 97°C por 35 segundos, 64°C por 35 segundos, 68°C por 4 minutos, acrescentando a este último 20 segundos a cada novo ciclo; e finalizado com extensão a 68°C por 10 minutos. O tamanho final esperado de cada produto da PCR é de 221 pares de bases (excluindo as repetições de CGG). A sequência dos iniciadores está apresentada na Tabela 4 e os seus locais de anelamento no gene FMR1 representado na Figura 4.

4.4.2 Eletroforese em Gel de Agarose

Quinze µl do produto da PCR, juntamente com 2 µl do tampão de corrida (azul de bromefenol 0,03%, xileno cianol 0,03% e laranja G 0,4%) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, contendo 0,05 mg de brometo de etídio. O gel foi previamente preparado pela diluição de 2 g agarose (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em TAE (tris, ácido acético e EDTA) 1X q.s.p. 100 ml, seguida de aquecimento a 60°C. A solução foi vertida em aparato horizontal para eletroforese (Horizon 11.14, GibcoBRL,

Gaithersburg, MD, USA) e foi permitida a polimerização à temperatura ambiente por 20 minutos. A eletroforese ocorreu a 130 V por aproximadamente 60 minutos em tampão TAE 1X e o resultado, produto da PCR, pôde ser visualizado através de transluminador ultravioleta (UVP, Upland, CA, USA).

4.4.3 Visualização dos Produtos da PCR e Determinação do Número de Repetições de CGG

Terminado o processo de eletroforese, os produtos da PCR foram visualizados em transluminador ultravioleta e o tamanho de cada fragmento obtido (banda) comparado a um marcador de pares de bases conhecido (50 bp DNA Step Ladder, Promega Corporation, Madison, WI, USA). Com o tamanho do fragmento em pares de bases é possível calcular o valor aproximado do número de repetições de CGG presente em cada amostra analisada. Para tanto se subtrai o valor esperado do produto da amplificação sem a repetição do trinucleotídeo CGG (221 pares de bases), que se refere à soma do número de bases de cada iniciador (Iniciador C e Iniciador F), e o número de bases que flanqueiam a região de repetições de CGG do gene FMR1 (Ver Figura 4). O diagnóstico é definido pelo número de repetições de CGG, a visualização dos fragmentos amplificados está representada na Figura 5 e segue o mesmo protocolo descrito para a técnica de PCR-T.

4.5 Análise Estatística

A análise estatística de dados certifica se os resultados de uma pesquisa são significativos, isto é, se representam a realidade ou se variaram ao acaso. Ao analisar dados de uma pesquisa, o objetivo é retirar a melhor conclusão possível das informações obtidas ao final de um experimento. Diferenças importantes podem estar mascaradas por variação biológica ou imprecisão experimental. Isto dificulta a distinção entre o que é real e o que variou ao acaso. A inclinação natural é concluir que as diferenças são reais e minimizar a contribuição de variabilidade aleatória. O rigor estatístico previne estes erros (Graphpad, Copyright 1992-1998).

Os dados obtidos nesta pesquisa foram submetidos a testes estatísticos não-paramétricos e paramétricos, dependendo das informações a analisar. O teste de χ^2 (Chi quadrado) foi utilizado na análise de significância de diferenças entre dois grupos, e a prova de McNemar Chi quadrado foi aplicada na análise de significância de mudanças em

ensaios com duas amostras relacionadas (Siegel, 1975). Na comparação de medidas resultantes de dois métodos, foi utilizado o teste de Bland & Altman. Este teste fornece um limite de variação de valores entre as técnicas e as diferenças resultantes dos dois métodos são analisadas conforme os limites estabelecidos (Grenier *et al.*, 2000). O Teste *t* pareado foi empregado para estudo de comparação das mesmas amostras experimentais em momentos diferentes. Para realização dos testes e avaliação da significância dos resultados, foram utilizados os programas computacionais Statistica 6.0 e SPSS 13.0 (SPSS, 1989 - 2004; Statistica, 2001). O nível para significância de resultados adotado foi o de $p < 0,01$.

5. Resultados e Discussão

Os dados analisados e apresentados neste capítulo foram reunidos conforme a conclusividade e inconclusividade dos resultados. Os conclusivos foram classificados em grupos, de acordo com o número de repetições de CGG, e de acordo com a indicação clínica para a Síndrome do X Frágil, considerando-se em ambos os casos o sexo dos pacientes avaliados.

A análise de dados de grupos classificados por idade não foi considerada relevante, pois a mutação genética é estável no decorrer do tempo em um mesmo indivíduo, ou seja, não varia conforme a idade. O número de repetições de CGG dos pacientes definidos pelas técnicas de PCR-T e PCR-P foram comparados quanto à concordância dos resultados e quanto à frequência observada na população estudada.

As considerações finais do capítulo incluem uma proposta de estratégia de diagnóstico para pacientes com indicação clínica da SXF utilizando as técnicas analisadas. Outras sugestões são consideradas para o rastreamento da pré-mutação na população, utilizando uma das ferramentas avaliadas, e a inclusão de informações de frequência (incidência) dos grupos classificatórios no laudo final dos pacientes estudados. Por último, é apresentada uma sugestão de como os resultados deste trabalho podem ser incorporados aos laudos laboratoriais na pesquisa da Síndrome do X Frágil.

5.1 Análise dos Resultados dos Procedimentos de PCR

5.1.1 *Diagnósticos Conclusivos e Inconclusivos*

Os 244 resultados obtidos a partir das análises das amostras de sangue de 122 pacientes com indicação clínica para a Síndrome do X Frágil, pelas duas técnicas de PCR, PCR de Triagem (PCR-T) e PCR para Pré-mutação (PCR-P), foram classificados em dois grupos: **conclusivos** e **inconclusivos**. O diagnóstico foi definido como conclusivo quando os produtos resultantes da amplificação da região específica do gene FMR1 mostraram um alelo em pacientes do sexo masculino, ou dois alelos em pacientes do sexo feminino,

conforme apresentado esquematicamente na Figura 6. Resultados que não apresentaram nenhuma amplificação ou amplificação de apenas um alelo em pacientes do sexo feminino foram classificados como inconclusivos.

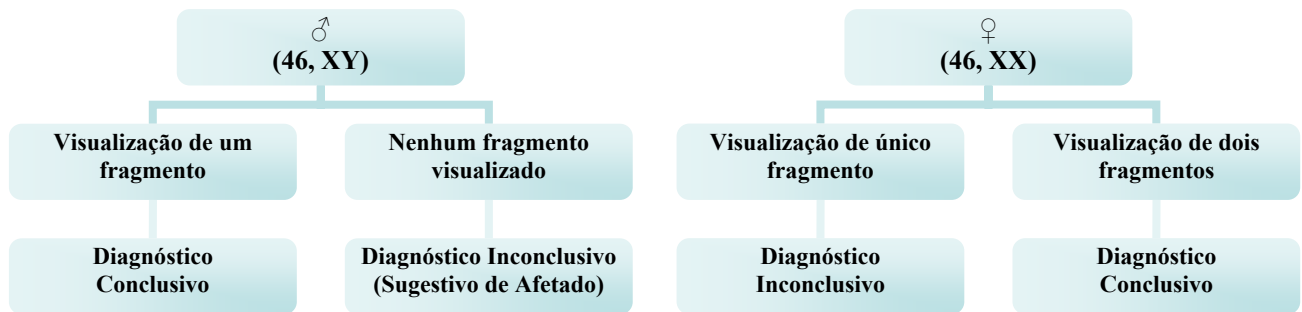


Figura 6. Esquema para definição de diagnóstico conclusivo ou inconclusivo de pacientes do sexo masculino (à esquerda) e feminino (à direita).

Para um resultado conclusivo em pacientes do sexo feminino deve-se, obrigatoriamente, ter a presença de dois alelos. Isto é decorrente da presença de dois cromossomos X (dois alelos do gene FMR1) no genoma feminino (46, XX). Existe a possibilidade de estes alelos serem idênticos (de mesmo tamanho), caracterizando paciente homozigota normal. Neste caso o resultado é classificado como inconclusivo, por ambas as técnicas. Devido a essa limitação intrínseca das técnicas de PCR, a visualização do resultado indicará a presença de apenas um dos alelos, pois eles ficam sobrepostos (Uma visualização característica, em gel de eletroforese, será apresentada na Figura 12, fileira 7, e na Figura 13, fileira 5). Homens, por apresentarem apenas um cromossomo X em seu genoma (46, XY), amplificam apenas um alelo do gene FMR1. Neste caso, a ausência da amplificação, além de resultar em diagnóstico inconclusivo, é sugestivo de paciente afetado pela síndrome (Figura 6).

A Figura 7 mostra o ganho que se tem ao se realizar os ensaios pela técnica de *Enhanced* PCR (PCR-P).

PCR-P comparado com PCR-T para o total de pacientes analisados

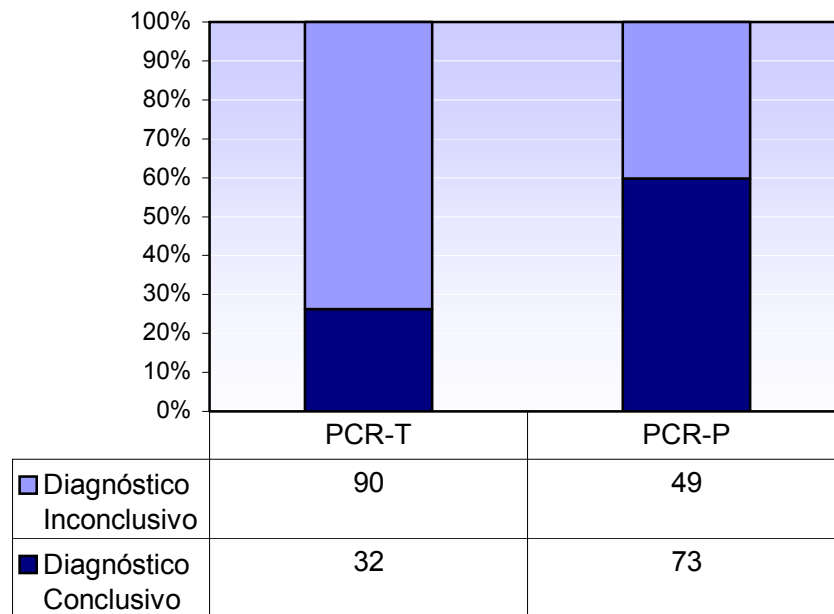


Figura 7. Influência da técnica de PCR para Pré-Mutação (PCR-P) em comparação com a PCR de Triagem (PCR-T) no diagnóstico de pacientes com indicação clínica para a síndrome de X-Frágil. O percentual de diagnósticos conclusivos e inconclusivos, para todos os pacientes analisados, é mostrado através das barras verticais e o número de casos na tabela adjacente.

Como pode ser claramente observado dessa figura, há uma melhora significativa na conclusividade do diagnóstico quando realizadas as análises pela técnica de PCR-P. Dos casos estudados, 26% e 60% foram conclusivos quando analisados pela técnica de PCR-T e PCR-P, respectivamente. O efeito da técnica de PCR para Pré-mutação, em comparação com a PCR de Triagem, é ainda mais evidente quando os resultados da análise das pacientes do sexo feminino são observados isoladamente (Figura 8).

Dos 100 casos de pacientes deste sexo, analisados pela técnica de PCR-T, apenas 12% foram conclusivos. Steiner e colaboradores (2005) obtiveram resultado similar no estudo de pacientes do sexo feminino pela técnica de PCR desenvolvida conforme Fu e colaboradores (1991), similar à PCR-T, onde foram observados apenas 8% de resultados conclusivos.

PCR-P comparado com PCR-T para pacientes do sexo feminino

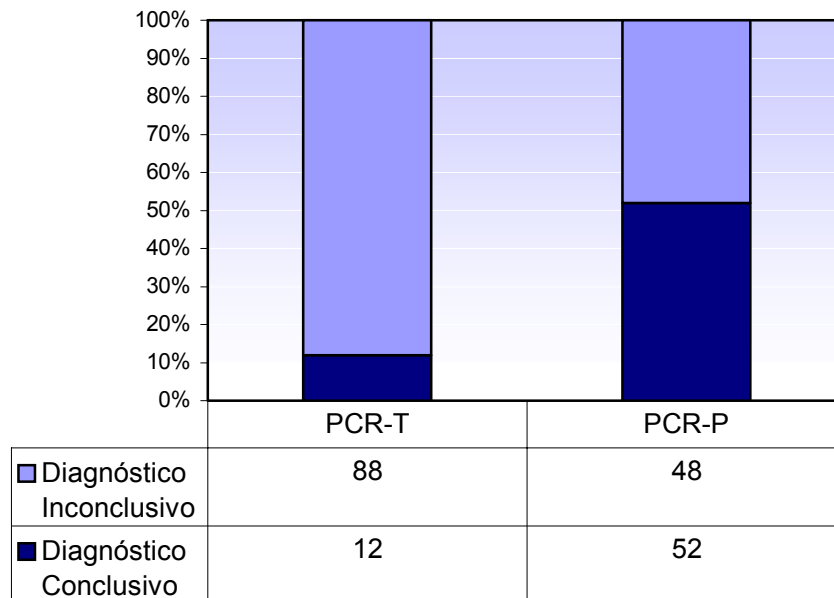


Figura 8. Número de casos e percentual de diagnósticos conclusivos e inconclusivos em pacientes do sexo feminino com indicação clínica para a síndrome de X-Frágil, quando analisados pela técnica de PCR-P em comparação com a técnica de PCR-T.

A análise das mesmas 100 amostras pela técnica de PCR-P resultou em 52% de diagnósticos conclusivos. A técnica de PCR-P mostrou ampla melhoria e maior eficiência na amplificação dos dois alelos e definição do diagnóstico das pacientes analisadas.

O aumento da taxa de diagnósticos conclusivos pela técnica de PCR-P em pacientes do sexo feminino ocorreu devido à eficácia na amplificação de alelos correspondentes à zona gray e pré-mutação e ao aprimoramento na amplificação de dois alelos na faixa normal.

Diferentemente do que ocorreu para as mulheres, não se observou variação significativa quanto à conclusividade, quando analisados apenas os resultados de pacientes do sexo masculino, como mostra a Figura 9.

PCR-P comparado com PCR-T para pacientes do sexo masculino

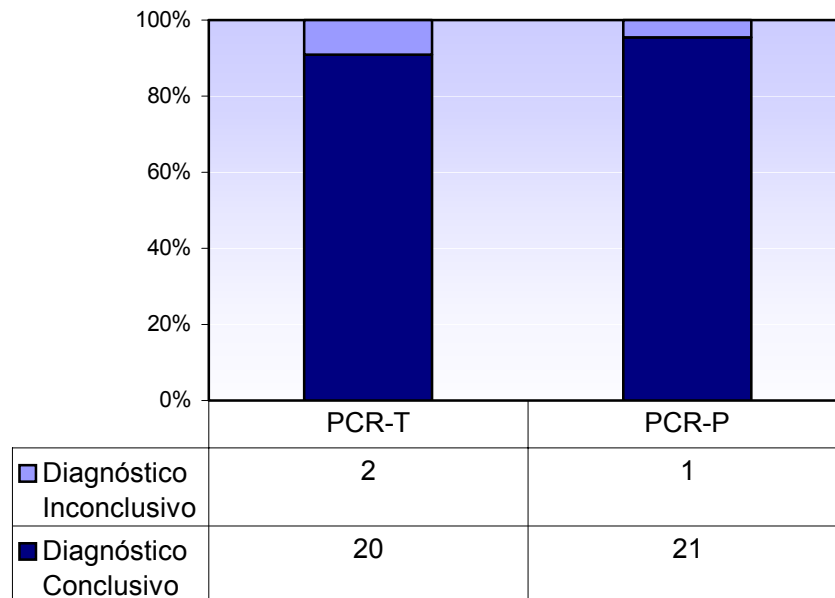


Figura 9. Número de casos e percentual de diagnósticos conclusivos e inconclusivos em pacientes do sexo masculino com indicação clínica para a síndrome de X-Frágil, quando analisados pela técnica de PCR-P em comparação com a técnica de PCR-T.

As análises estatísticas aplicadas ao estudo dos resultados conclusivos e inconclusivos, provenientes das técnicas de PCR-T e PCR-P apresentaram valor significativo quando submetidos à prova de McNemar Chi quadrado, $p < 0,01$. Os resultados de pacientes do sexo feminino analisados isoladamente revelaram $p < 0,01$ e os de pacientes do sexo masculino $p = 1,0$, este último não significativo. Porém, este resultado não significativo já era esperado, pois não houve muita variação quanto à conclusividade dos resultados de pacientes do sexo masculino entre uma técnica e outra. O teste de McNemar Chi quadrado é utilizado para análises de significância de mudanças em amostras relacionadas.

Amostras de seis pacientes (cinco do sexo feminino e um do sexo masculino) foram também analisadas pela técnica de Southern blotting, seguindo indicação médica. Estas análises foram realizadas em laboratório de análises genéticas conveniado ao Laboratório Neurogene. Destas amostras, quatro eram provenientes de pacientes (três mulheres e um

homem) com resultados inconclusivos quando analisados pelas técnicas de PCR-T e PCR-P. Duas mulheres não apresentaram qualquer mutação no loco FRAXA do gene FMR1, sendo classificadas como normais, e uma mulher e um homem foram diagnosticados como portadores da mutação completa, ou seja, estes pacientes são afetados pela SXF. Outras duas mulheres, analisadas pelas técnicas de PCR-T e PCR-P, com resultados inconclusivo e conclusivo, respectivamente. Nestes dois casos, o estudo por Southern blotting confirmou os resultados obtidos previamente pela técnica de PCR para Pré-mutação, corroborando o diagnóstico das pacientes como portadoras da pré-mutação.

5.1.2 Diagnósticos Conclusivos nos Diferentes Grupos Classificatórios: Normal, Zona Gray e Pré-mutado

Os resultados conclusivos provenientes das técnicas de PCR-T e PCR-P foram classificados em normal, zona-gray ou pré-mutado, conforme o número de repetições de CGG. O número de pacientes com diagnósticos conclusivos resultantes das análises das técnicas de PCR-T e PCR-P e sua distribuição nos três grupos classificatórios são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Número de pacientes com diagnóstico conclusivo e sua distribuição nos grupos classificatórios (normal, zona gray e pré-mutado). Dados comparativos das técnicas de PCR-T e PCR-P.

| Classificação/ Técnicas | ♂ | | ♀ | | Total de pacientes | |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|--------------------|----------|
| | PCR-T | PCR-P | PCR-T | PCR-P | PCR-T | PCR-P |
| Normal | 17 (85%) | 14 (67%) | 10 (83%) | 27 (52%) | 27 (84%) | 41 (56%) |
| Zona Gray | 03 (15%) | 04 (19%) | 02 (17%) | 17 (33%) | 05 (16%) | 21 (29%) |
| Pré-mutado | - | 03 (14%) | - | 08 (15%) | - | 11 (15%) |

É evidente a vantagem do uso da técnica PCR-P em relação à técnica de triagem para a detecção de zona gray e pré-mutados: enquanto se observa que apenas poucos casos de diagnóstico conclusivo foram reportados pela técnica de triagem (em verdade nenhum caso para o grupo de pré-mutados), esse número é expressivo para ambos os sexos quando se utiliza a técnica de *Enhanced* PCR. Observa-se que a técnica de PCR-P registra casos de diagnóstico positivo para pré-mutação, não detectados quando analisados pela técnica de PCR-T, para os dois sexos, embora o resultado seja mais evidente para pacientes do sexo

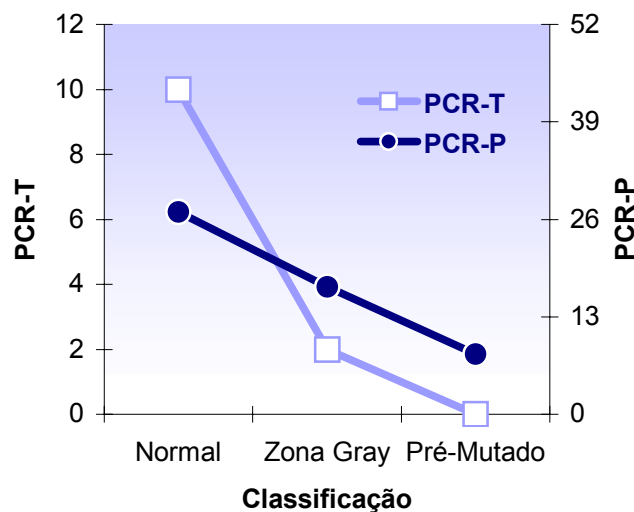
feminino. É importante lembrar que, enquanto os resultados da PCR de Triagem (PCR-T) não detectam pacientes com pré-mutação (o que é uma limitação intrínseca da técnica), as análises com *Enhanced* PCR (PCR-P) detectam até 330 repetições CGG para homens e 160 para mulheres (Saluto *et al.*, 2005). A Figura 10 mostra a distribuição dos pacientes com diagnóstico conclusivo nos diferentes grupos classificatórios. A Figura 10 a se refere aos diagnósticos conclusivos em pacientes do sexo feminino e a Figura 10 b em pacientes do sexo masculino.

O sexo dos pacientes enquadrados nos grupos normal e zona gray (84% e 16% do total de pacientes) não influenciou a distribuição do resultado de diagnósticos conclusivos pela técnica de PCR-T (Tabela 5, colunas 2 e 4). É importante salientar que esta técnica não ofereceu resultados de diagnóstico conclusivo para pré-mutação em qualquer dos casos analisados.

Quando os resultados da PCR-P são analisados, o sexo é uma influência importante: observa-se que, enquanto para o sexo feminino tem-se 33% dos diagnósticos conclusivos para zona gray, no sexo masculino tem-se apenas 19%. No grupo normal, esses números são 52% e 67%, respectivamente. No grupo dos pré-mutados, no entanto, não se observou mudança na porcentagem final de resultados nas análises de pacientes do sexo masculino e feminino (Ver Figura 10 e Tabela 5).

O teste de Chi quadrado, isto é, a análise estatística não-paramétrica para amostras não-relacionadas, aplicado no estudo dos resultados das classificações dos pacientes pelas técnicas de PCR-T e PCR-P, resultou em $p < 0,01$, indicando significância, na análise de dados de pacientes do sexo feminino. Para pacientes do sexo masculino o resultado da análise estatística mostrou $p < 0,2$. Embora este dado não seja significativo, ele mostra uma tendência, que poderia ser comprovada se analisada uma amostra maior de resultados conclusivos. A análise do total de pacientes resultou em $p < 0,01$.

a) Número de pacientes do sexo feminino com diagnóstico conclusivo



b) Número de pacientes do sexo masculino com diagnóstico conclusivo

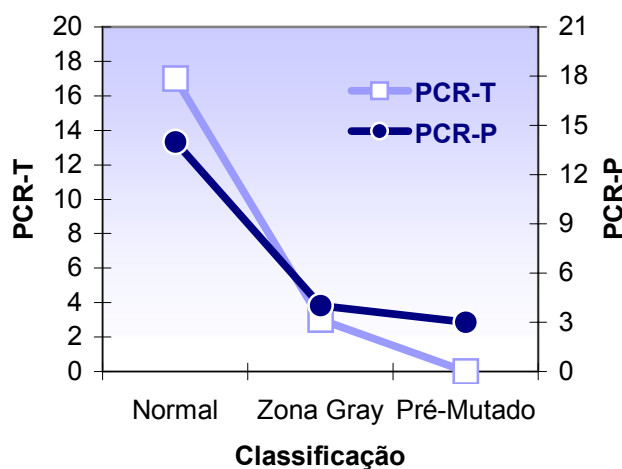


Figura 10. Distribuição dos pacientes com diagnóstico conclusivo nos diferentes grupos classificatórios (normal, zona gray e pré-mutado), empregando-se as técnicas de PCR-T e PCR-P. a) Pacientes do sexo feminino, b) Pacientes do sexo masculino.

É interessante notar que, além da técnica de PCR-P ser mais eficaz no diagnóstico conclusivo, foram também observados alguns casos de mudança de classificação. A Tabela 6 mostra casos diagnosticados de forma conclusiva pelas duas técnicas de PCR, que foram classificados em diferentes grupos, de um total de 32 pacientes estudados.

Embora em termos absolutos os números possam parecer não muito significativos, as detecções de dois casos de zona gray e pré-mutação são importantes no diagnóstico definitivo de cada paciente. Destaca-se esta importância principalmente nos casos de pré-mutação, pois estes podem transmitir a mutação completa para futuras gerações.

Tabela 6. Número de casos diagnosticados com diferentes classificações pelas duas técnicas de PCR, de um total de 32 casos estudados.

| Classificação | | Número de casos com diferentes diagnósticos | | |
|------------------------------------|--|---|-------------|-------------|
| PCR-T (Fu <i>et al.</i> , 1991) | PCR-P (Saluto <i>et al.</i> , 2005) | Total de casos | ♂ | ♀ |
| Normal | Zona Gray | 2 | 1 | 1 |
| Normal | Pré-mutado | 2 | 2 | - |
| Normal* | Normal* | 2 | 1 (47, XXY) | 1 (47, XXX) |

* Embora esses pacientes sejam classificados no grupo normal para o polimorfismo CGG, estes são casos específicos de anomalia cromossômica.

Os dois pacientes diagnosticados com pré-mutação pela técnica de PCR-P foram enquadrados no padrão de mosaicismo (visualização de alelo normal e alelo pré-mutado). Além disso, são provenientes de famílias já confirmadas como portadoras da síndrome. Nestes casos, fica evidente a necessidade de análise por outra técnica, além da triadora (PCR-T).

No caso dos pacientes diagnosticados como zona gray pela técnica de PCR-P, também com padrão de mosaicismo, apesar de não apresentarem risco de transmissão da mutação completa para futuras gerações, a definição do diagnóstico é igualmente importante, pois dela depende o tratamento aplicado a cada caso.

A técnica *Enhanced* PCR apresentou maior confiabilidade no estudo de pesquisa de famílias portadoras da SXF. Entretanto, em estudos de pacientes com familiares portadores da pré-mutação ou mutação completa com padrão de mosaicismo é sugestivo o estudo por Southern blotting, que pode descartar a presença de maior expansão do trinucleotídeo.

Foram também detectados dois casos anômalos: um caso de Triplo X (47, XXX) e outro de Síndrome de Klinefelter (47, XXY), sendo o primeiro caso observado apenas pela

técnica de PCR-P e o segundo pela PCR-T e PCR-P (Tabela 6). As análises da amostra do paciente do sexo masculino revelaram a presença de dois alelos na faixa da normalidade. Esse resultado é imprevisível, pois homens (46, XY) amplificam apenas um alelo. Para este caso, foi considerada e realizada a análise citogenética (Laboratório Neurogene, Florianópolis, SC), isto é, o cariótipo, para pesquisar a possibilidade de o paciente ser portador da Síndrome de Klinefelter. A hipótese foi confirmada e o diagnóstico concluído.

Há relatos da utilização da técnica de ms-PCR de pesquisa do gene FMR1 no diagnóstico da Síndrome de Klinefelter (Pena e Sturzeneker, 2003). Estes autores analisaram, por ms-PCR, amostras de 15 pacientes diagnosticados previamente por cariótipo como portadores da Síndrome de Klinefelter. A ms-PCR detectou a presença de alelo normal e metilado, indicando a presença do duplo X.

É importante ressaltar que a utilização da técnica de PCR-T ou PCR-P para diagnóstico da Síndrome de Klinefelter nunca foi relatada e o caso aqui analisado pode ter sido um caso isolado. Se utilizadas para esta finalidade, provavelmente serão encontradas as mesmas dificuldades relatadas no diagnóstico de mulheres para a SXF, em virtude da necessidade da amplificação de dois alelos para obter conclusividade de resultado. Para confirmar estas suspeitas, mais estudos são necessários.

Em outro caso, uma paciente do sexo feminino apresentou dois alelos pela técnica de PCR-T e três alelos pela PCR-P, todos na faixa da normalidade. O diagnóstico foi considerado conclusivo para a SXF, classificando-a como paciente normal. Porém, há a suspeita de doença cromossômica, o Triplo X, que também pode causar dificuldade de aprendizado (Barch *et al.*, 1997). Para confirmação deste diagnóstico é necessária uma análise de cariótipo.

5.1.3 Diagnósticos Conclusivos nos Diferentes Grupos Classificatórios e sua Relação com a Indicação Clínica dos Pacientes

As amostras com resultados conclusivos, 32 pela PCR-T e 73 pela PCR-P, foram analisadas conforme as indicações clínicas dos pacientes em dois grupos: pacientes com suspeita clínica da SXF e pacientes com histórico familiar da SXF.

A Tabela 7 mostra os resultados conclusivos distribuídos nos grupos classificatórios, sua correlação com a indicação clínica, e comparação dos dados das

técnicas de PCR-T e PCR-P. Observa-se que, nos casos de pacientes com suspeita clínica para a SXF, a técnica de PCR-P dobrou o número de ocorrências de diagnóstico dos grupos normal e zona gray, embora a proporção tenha permanecido estável (Colunas 2 e 3 da Tabela 7). Nenhum caso de pré-mutação foi observado neste grupo (Suspeita Clínica) de pacientes. Em verdade, é esperado que a pré-mutação seja mais observada no grupo de pacientes com histórico familiar para a SXF, devido ao padrão de transmissão e herança da doença. Apesar de os pacientes com suspeita clínica apresentarem sintomas comuns na SXF, estes podem estar relacionados a outros distúrbios.

Tabela 7. Número do total de pacientes com diagnóstico conclusivo, sua distribuição nos grupos classificatórios (normal, zona gray e pré-mutado) e a correlação com a indicação clínica. Dados comparativos das técnicas de PCR-T e PCR-P.

| <i>Indicação Clínica/ Técnicas/ Classificação</i> | <i>Suspeita Clínica</i> | | <i>Histórico Familiar</i> | |
|---|-------------------------|----------|---------------------------|----------|
| | PCR-T | PCR-P | PCR-T | PCR-P |
| Normal | 13 (87%) | 24 (86%) | 14 (82%) | 17 (38%) |
| Zona Gray | 02 (13%) | 04 (14%) | 03 (18%) | 17 (38%) |
| Pré-Mutado | - | - | - | 11 (24%) |
| TOTAL de pacientes | 15 | 28 | 17 | 45 |

No grupo de pacientes com histórico familiar para a SXF, a PCR para Pré-mutação aumentou o número de diagnósticos conclusivos em todas as classificações quando comparada à PCR de Triagem (Tabela 7, colunas 4 e 5). O aumento é mais pronunciado nos casos de zona gray e pré-mutação. Este último, como já foi abordado, foi detectado somente pela PCR-P (11 casos). Esta análise destaca a melhora na definição do diagnóstico de pacientes com pré-mutação, principalmente para aqueles com histórico familiar, e a necessidade de complementação do diagnóstico por outra técnica além da PCR-T.

É digno de nota que a definição da presença ou ausência da pré-mutação é de grande importância no aconselhamento genético, tratamento e prevenção da doença.

A prova estatística de McNemar Chi quadrado aplicada para o estudo dos pacientes com histórico familiar e suspeita clínica da Síndrome do X Frágil obteve resultado significativo: $p < 0,01$, para ambos os grupos, ou seja os resultados foram, assim, estatisticamente validados.

5.1.4 *Análise de Variação do Número de Repetições de CGG das Amostras Analisadas pela Técnica de PCR-T em Comparação com a PCR-P*

A comparação dos resultados, em número de repetições de CGG, dos alelos dos pacientes estudados pelas técnicas de PCR-T e PCR-P foram variáveis em alguns casos. Das 120 amostras analisadas, 71 (59%) apresentaram alguma variação no número de repetições de CGG. Destas variações, 70% ocorreram em pequena escala e, nestes casos, a diferença foi de apenas uma ou duas repetições de CGG, com mediana (das variações) de 2 CGG. A maior diferença encontrada foi a de oito repetições de CGG, mas, novamente, sem alteração na classificação e diagnóstico do paciente.

Em apenas dois casos (2% do total) ocorreu alteração da classificação do paciente, ambos de normal para zona gray. Porém, nestes casos, os alelos variaram de 37 repetições de CGG para 40 repetições de CGG, resultados provenientes das técnicas de PCR-T e PCR-P, respectivamente. Resultados observados em regiões limítrofes das classificações da SXF não podem ser avaliados pelo número de repetições de CGG isoladamente; devem ser considerados a manifestação clínica e o histórico familiar de cada paciente. Os casos considerados não foram prejudicados pela variação apresentada, sendo um deles inconclusivo, devido à visualização única do alelo de 37 CGG.

Dos casos estudados, os resultados referentes à variação no número de repetições de CGG de um mesmo alelo analisado pelas duas técnicas, PCR-T e PCR-P, se mostrou estável e confiável. A análise estatística destes dados revelou média de variação de repetições de 2,41 CGG, mediana de 2,00 CGG e desvio padrão de 1,75.

A aplicação do método de Bland & Altman para análise de concordância de medidas entre dois métodos apresentou alguns pontos, que indicam a diferença de resultado entre as técnicas, que ultrapassam limites de concordância. Os mesmos dados analisados em categorias foram considerados com valor de concordância confiável.

5.1.5 *Variação no Número de Repetições de CGG das Amostras Analisadas em Duplicata pela Técnica de PCR-T e PCR-P*

A ocorrência de pequenas variações no número de repetições de CGG em exames realizados em duplicata pode ser observada. A reprodução técnica dificilmente é desenvolvida de forma idêntica, principalmente quando executada por diferentes

profissionais. Diferenças na alíquota de produtos para confecção de géis para corrida eletroforética podem resultar em variação da porosidade e, conseqüentemente, na velocidade de corrida do produto da PCR; a definição do tamanho do fragmento analisado em pares de bases também é um ponto crítico, por ser uma análise visual; pequenas variações podem ocorrer de uma leitura para outra.

Quarenta amostras foram analisadas em duplicata, repetição do exame de uma mesma amostra pela mesma técnica, pela PCR-T e trinta amostras analisadas pela PCR-P. As duplicatas revelaram variação do número de repetições de CGG. Pela técnica de PCR-T, na análise de um mesmo paciente, o resultado variou em até 5 repetições de CGG e pela PCR-P, em até 3 repetições de CGG. Outra vez, em nenhum dos casos houve modificação da classificação e diagnóstico dos pacientes. Nenhuma variação quanto ao número de repetições de CGG ocorreu em 34% dos pacientes estudados em duplicata pela PCR-T e em 72% daqueles estudados pela PCR-P.

A análise estatística, utilizando o Teste *t* de amostras pareadas, mostrou um desvio padrão de 1,67 para a PCR-T e 0,83 para a PCR-P.

Avaliando os números observados e os desvios calculados, sugere-se que seja considerada a variação de ± 4 repetições de CGG (dois desvios padrões) nos resultados provenientes das técnicas de PCR-T, e ± 2 repetições de CGG para resultados da PCR-P no diagnóstico da SXF.

5.1.6 Ocorrências do Número de Repetições de CGG e Provável Frequência Alélica na População do Estado de Santa Catarina

Das amostras dos 122 pacientes analisados, 115 são provenientes de pacientes residentes no Estado de Santa Catarina. Pelo método de PCR de Triagem, o alelo mais frequentemente observado nestas 115 análises foi o de 28 repetições de CGG (visualizado em 47 de 125 alelos analisados, o que representa 38% do total), seguido do alelo de 29 CGG (em 15 dos 125 alelos, ou 12%).

No método de *Enhanced* PCR, os alelos mais observados foram os de 28 repetições de CGG e 30 CGG, ambos em 56 de 169 alelos (Figura 11). O maior número de alelos definidos pela PCR-P, 169 contra os 125 identificados por PCR-T, deve-se ao fato da

técnica ser mais eficiente quanto à conclusividade; consequentemente, mais alelos são observados.

Os resultados observados nesta pesquisa são similares a outras pesquisas de frequências alélicas do loco FRAXA do gene FMR1, publicados previamente (Brown *et al.*, 1993).

A partir dos dados obtidos pode-se sugerir que os alelos de 28 e 30 repetições de CGG são os mais comumente observados na população do Estado de Santa Catarina.

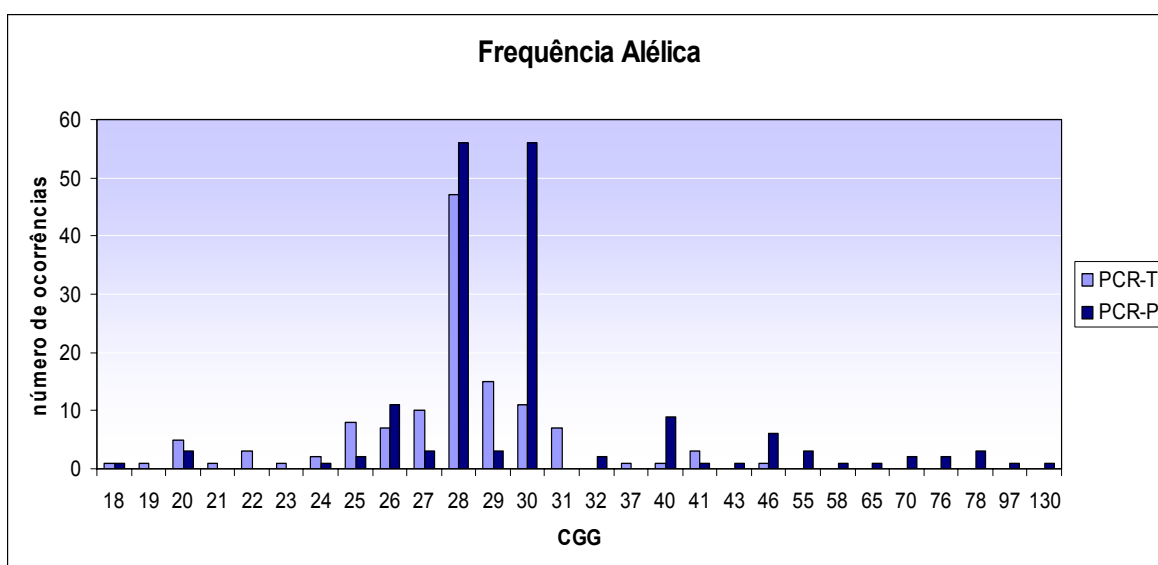


Figura 11. Número de ocorrências das repetições de CGG, de acordo com os alelos mais frequentemente observados pelas técnicas de PCR-T e PCR-P, em 115 pacientes analisados do Estado de Santa Catarina.

É interessante observar que há uma tendência maior de ocorrência de números de pares de repetições CGG. Por exemplo, somados os resultados das duas técnicas, evidencia-se maior número de ocorrências para 28 e 30 repetições do que para 29 e 31 repetições CGG.

5.1.7 Interpretação e Visualização dos Produtos da Amplificação da PCR-T e PCR-P em Géis de Agarose e Poliacrilamida

A visualização e definição do tamanho do fragmento amplificado pelas técnicas de PCR permitem o cálculo do número de repetições de CGG presentes em cada amostra analisada. Para tanto, deve-se seguir conforme descrito nas seções 4.3.3 e 4.4.3,

dependendo do tipo de gel e iniciadores utilizados. Cada resultado, em número de repetições de CGG, é enquadrado em uma das classificações da SXF.

Os géis de poliacrilamida, corados com nitrato de prata, e de agarose, corados com brometo de etídio, permitiram a visualização dos alelos amplificados pelas reações de PCR (Ver Figura 12 e 13).

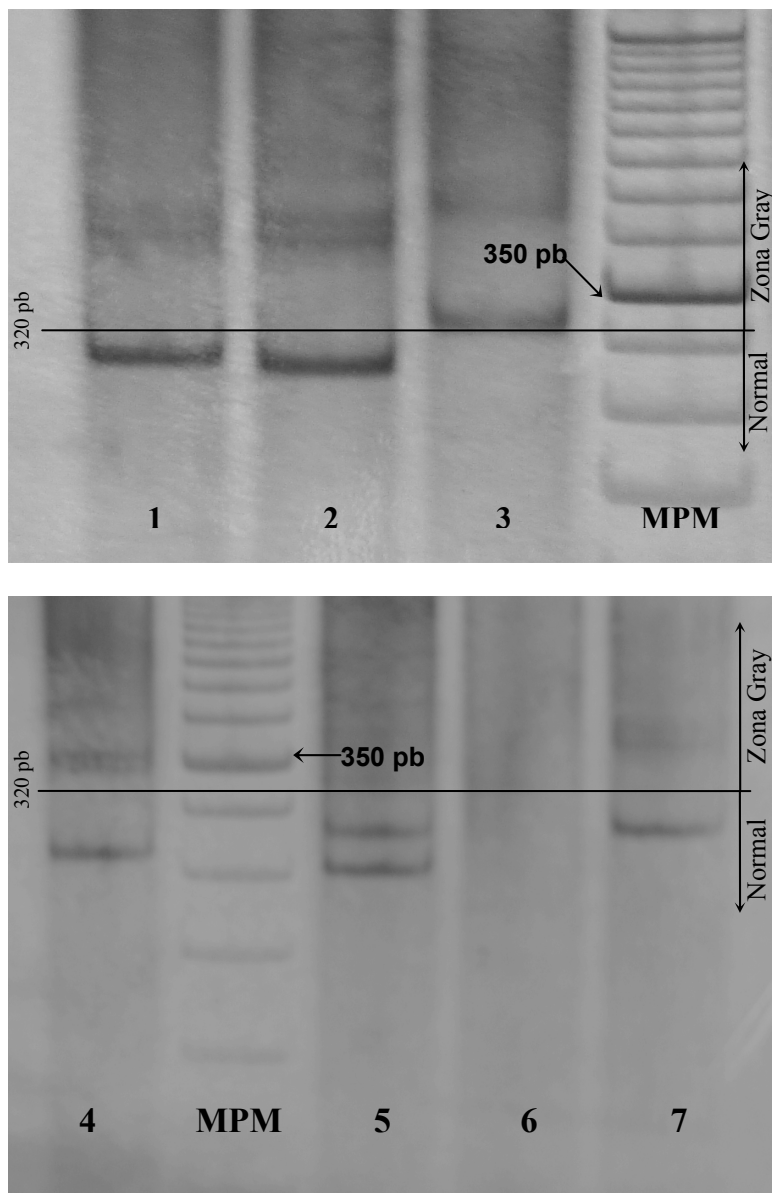


Figura 12. Visualização dos fragmentos amplificados pela PCR-T em gel de poliacrilamida. Alelos normais de pacientes do sexo masculino estão localizados nas fileiras 1, 2 e 4, alelo zona gray na fileira 3 e resultado inconclusivo na fileira 6. Alelos normais de pacientes do sexo feminino encontram-se na fileira 5 e resultado inconclusivo na fileira 7. “MPM” se refere a marcador de peso molecular e “pb” a pares de bases.

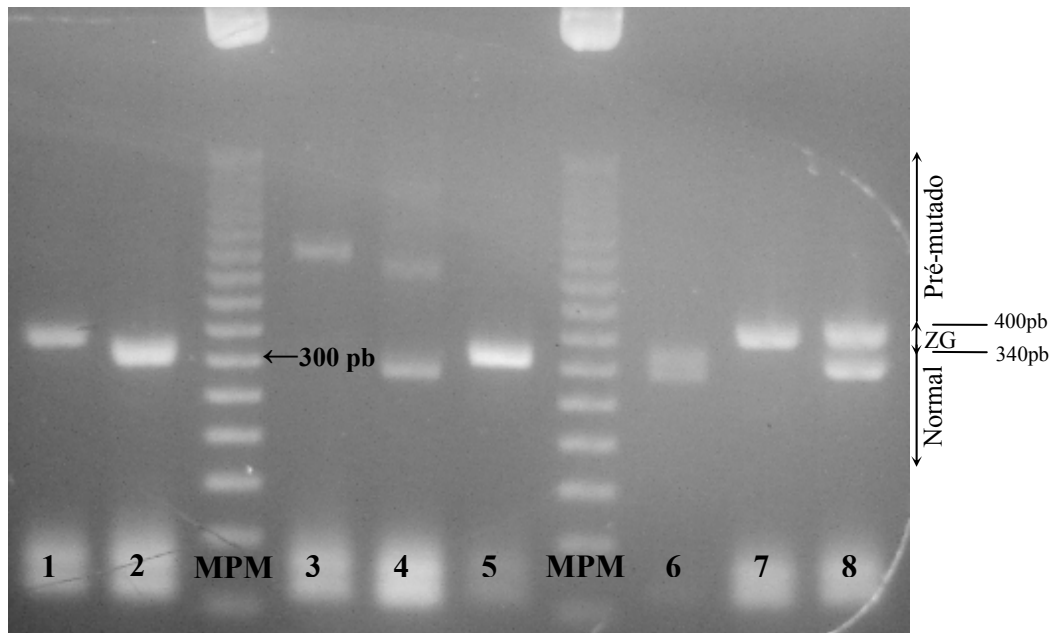


Figura 13. Visualização dos fragmentos amplificados pela PCR-P em gel de agarose. Alelos normais de pacientes do sexo masculino estão localizados nas fileiras 1 e 2, pré-mutado na fileira 3, e zona gray na fileira 7. Alelos normal e pré-mutado de pacientes do sexo feminino estão na fileira 4, um alelo normal (resultado inconclusivo) na fileira 5, dois normais na fileira 6, e normal e zona gray na fileira 8. “MPM” se refere a marcador de peso molecular e “pb” a pares de bases e “ZG” a zona gray.

Dos produtos da PCR-T foram observados, nos géis de poliacrilamida, alelos localizados na faixa da normalidade e zona gray (Figura 12). A região limítrofe entre estas classificações está representada por uma reta, na figura, e está localizada em 320 pares de bases. Todos os alelos localizados acima da reta são classificados como zona gray, e todos abaixo, normais. Aqueles posicionados em 320 pares de bases, sobre a reta, possuem aproximadamente 40 repetições de CGG ($320 - 198 / 3$). Na Figura 12, fileira 5, existem dois alelos normais bem definidos e de fácil identificação, resultado de paciente do sexo feminino normal para a SXF. Na fileira 6, a não amplificação do alelo evidencia um resultado inconclusivo, e é, portanto, sugestivo de paciente afetado pela SXF.

Nos géis de agarose, dos produtos da PCR-P amplificados, foram observados alelos na faixa da normalidade, zona gray e pré-mutação (Figura 13). Todos os fragmentos localizados entre 340 pares de base e 400 pares de base são alelos zona gray, correspondentes a alelos entre 40 e 60 repetições de CGG, respectivamente. Abaixo desta

região estão os alelos normais e acima, os pré-mutados. Na Figura 13 dois alelos pré-mutados, um de pacientes do sexo feminino, fileira 4, e outro de paciente do sexo masculino, fileira 3, podem ser observados. Em pacientes do sexo feminino as bandas dos produtos de PCR provenientes da amplificação do alelo pré-mutado se mostraram mais fracas, de menor intensidade, quando comparadas ao alelo de menor tamanho, normal. Métodos de PCR capazes de detectar diferentes alelos e grandes expansões sempre favorecem a amplificação do menor alelo (Maddalena *et al.*, 2001).

Embora a PCR-P tenha possibilitado a visualização de bandas com pré-mutação, o posicionamento e a nitidez dos fragmentos da PCR-T em gel de poliacrilamida foi melhor, comparado com os fragmentos do gel de agarose. Géis feitos de polímeros de acrilamida são amplamente utilizados em eletroforese de DNA e a resolução das bandas é geralmente melhor comparada com gel de agarose corado com brometo de etídio (Godde *et al.*, 2006).

A amplificação de seqüências de DNA que contenham repetições de trinucleotídeos é problemática devido à formação de estruturas secundárias. Regiões ou sítios reconhecidos como locais de pausa da DNA polimerase podem estar próximos a *hairpins*, estruturas secundárias normalmente formadas em regiões ricas em GC. A betaína, utilizada no protocolo da PCR-P, elimina as pausas causadas pelos *hairpins* e permite a completa amplificação da seqüência de repetições de CGG (Gacy *et al.*, 1995). Para solucionar o mesmo problema, o protocolo da PCR-T inclui a utilização de reagentes que facilitam a separação da fita de DNA, 7-deaza-dGTP e DMSO. Porém, a adição destes reagentes reduz a detecção dos produtos de PCR em gel de agarose corado com brometo de etídio; portanto, são utilizados os géis de poliacrilamida (Innis *et al.*, 1990). Normalmente, nestas técnicas, após a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida, sugere-se a hibridização dos produtos da PCR com sondas de CGG marcadas com radioisótopos, ou quimioluminescência para detecção de maiores amplificações. Porém, esta etapa torna a técnica laboriosa e de alto custo, dificultando sua utilização como método de triagem.

Os maiores alelos amplificados, nas amostras analisadas neste trabalho, por PCR-T foram de 41 repetições de CGG, em paciente do sexo feminino, e de 46 repetições de CGG em paciente do sexo masculino. A PCR-T permitiu, assim, a visualização de alelos normais e zona gray.

A técnica de PCR-P foi eficiente na amplificação de alelos com grande número de repetições de CGG, sendo os maiores alelos detectados os de 130 repetições de CGG, em paciente do sexo feminino, e de 93 repetições de CGG em paciente do sexo masculino.

O protocolo da PCR-P permite a visualização direta dos produtos da PCR em gel de agarose corado com brometo de etídio, eliminando a necessidade da etapa de hibridização para a visualização de alelos pré-mutados. Além disso, também foi mais eficiente na visualização de conclusividade de alelos menores, normais, principalmente em pacientes do sexo feminino, não deixando dúvidas de suas vantagens comparadas à PCR-T.

A Tabela 8 resume os principais dados e resultados obtidos neste trabalho pela análise das amostras dos 122 pacientes com indicação clínica para a Síndrome do X Frágil pelas técnicas utilizadas no diagnóstico laboratorial.

Tabela 8. Resultados obtidos de acordo com as técnicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial da SXF, de 122 pacientes estudados, e correlação com o sexo e indicação clínica.

| Número de Pacientes | Indicação Clínica | | Técnica de Diagnóstico | | | |
|---------------------|-------------------|--------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------------|
| | Suspeita Clínica | Histórico familiar | PCR-T | PCR-P | Southern blotting | Cariótipo |
| 18 ♀ | 11 | 7 | Inconclusivo | Normal | - | - |
| 14 ♀ | 2 | 12 | Inconclusivo | Zona Gray | - | - |
| 8 ♀ | 0 | 8 | Inconclusivo | Pré-mutada | Pré-mutada (2) | - |
| 48 ♀ | 29 | 19 | Inconclusivo | Inconclusivo | Normal (2) Afetada (1) | - |
| 8 ♀ | 5 | 3 | Normal | Normal | - | - |
| 1 ♀ | 0 | 1 | Normal | Normal Triplo X (?) | - | - |
| 1 ♀ | 0 | 1 | Normal | Zona Gray | - | - |
| 2 ♀ | 0 | 2 | Zona Gray | Zona Gray | - | - |
| 1 ♂ | 0 | 1 | Inconclusivo | Pré-mutado | - | - |
| 1 ♂ | 1 | 0 | Inconclusivo | Inconclusivo | Afetado | - |
| 13 ♂ | 7 | 6 | Normal | Normal | - | - |
| 1 ♂ | 1 | 0 | Normal | Normal Síndrome Klinefelter (?) | - | Síndrome Klinefelter |
| 1 ♂ | 0 | 1 | Normal | Zona Gray (mosaicismo) | - | - |
| 2 ♂ | 0 | 2 | Normal | Pré-mutado (mosaicismo) | - | - |
| 3 ♂ | 2 | 1 | Zona Gray | Zona Gray | - | - |

5.2 Proposta de Estratégia para Diagnóstico Laboratorial da SXF

O diagnóstico laboratorial e clínico da SXF segue recomendações de Guias Internacionais de Diagnóstico da SXF (Maddalena *et al.*, 2001; Biancalana *et al.*, 2006). Para o diagnóstico laboratorial são indicados os exames pelas técnicas de PCR para triagem inicial e sua combinação com o Southern blotting, quando necessária.

Uma estratégia de diagnóstico é proposta a seguir, incluindo o “Enhanced PCR” ou PCR para Pré-mutação, como técnica de PCR preferencial na triagem de mulheres e de homens com histórico familiar da SXF (Ver Figura 14 e Figura 15).

Para pesquisa da expansão de repetições de CGG, no gene FMR1 em mulheres, com suspeita clínica e/ou histórico familiar para a SXF, sugere-se a triagem do diagnóstico pela técnica de PCR-P. Esta técnica confirmou sua eficácia na amplificação de alelos pré-mutados em pacientes do sexo feminino. Neste caso, também foi evidenciada a melhor conclusividade de diagnósticos, incluindo aqueles de pacientes normais, comparada com a técnica de PCR de Triagem, normalmente utilizada como método de triagem.

Ainda, para resultados de pacientes do sexo feminino que permanecerem inconclusivos pela técnica de PCR-P, sugere-se prosseguir com a investigação familiar, estudo do gene materno e paterno, já que a doença é hereditária, ligada ao cromossomo X e todos os indivíduos afetados pela SXF têm um ascendente portador da pré-mutação.

O teste PCR-P nos pais de pacientes do sexo feminino pode descartar ou enfatizar a suspeita da SXF. Caso os pais sejam normais para a pesquisa da mutação no gene FMR1, a paciente em questão herdou, consequentemente, genes normais e, portanto, é normal para a SXF.

Resultados dos genes materno e paterno inconclusivos ou a presença de pré-mutação requerem o estudo por Southern blotting para definição do diagnóstico. O resultado da análise dos pais auxilia na conclusão final do diagnóstico da paciente em análise e pode evitar a utilização do estudo por Southern blotting, exame de alto custo e de longo tempo de análise.

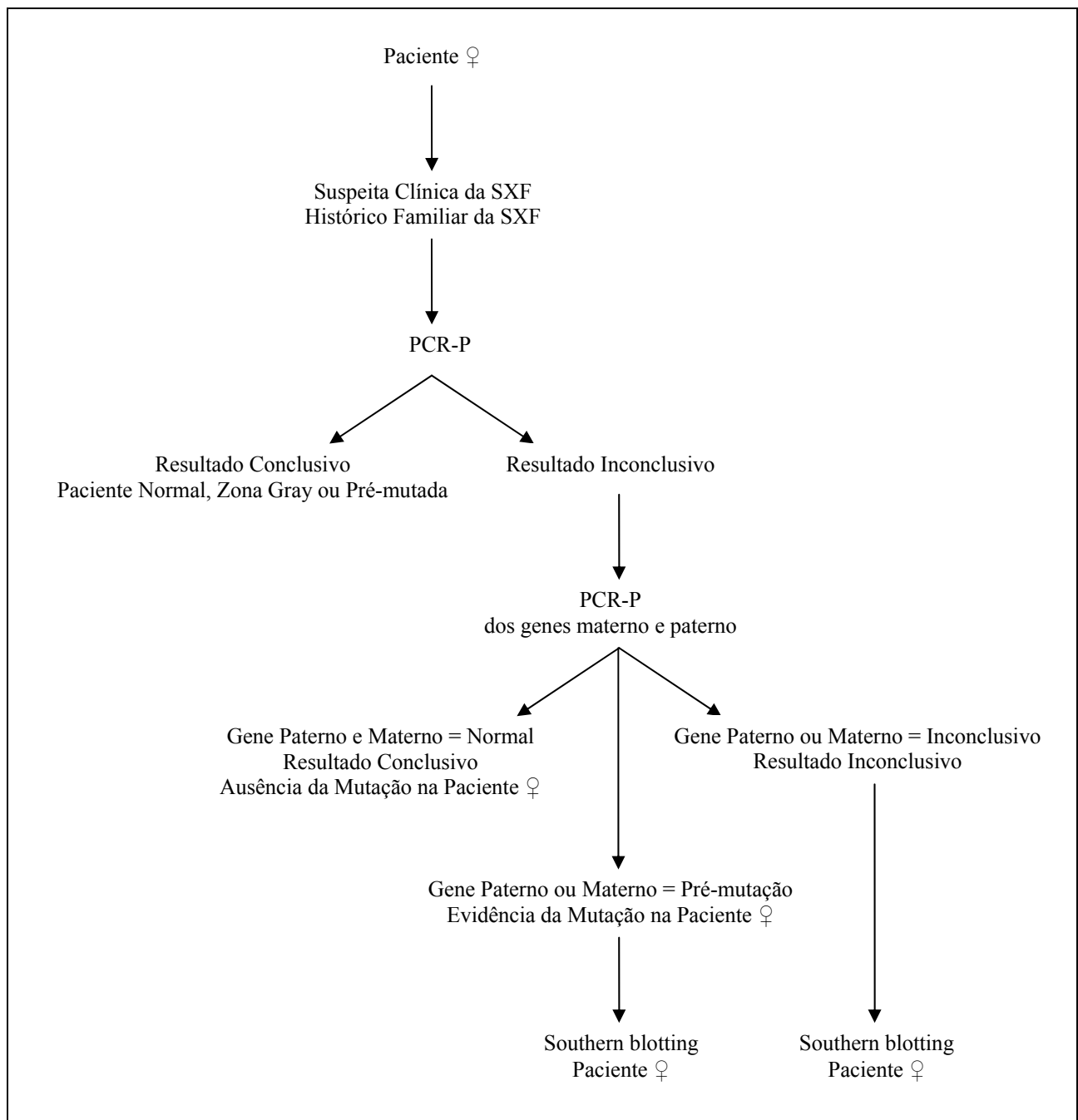


Figura 14. Fluxograma proposto para diagnóstico laboratorial da SXF em mulheres com suspeita clínica ou histórico familiar para a síndrome.

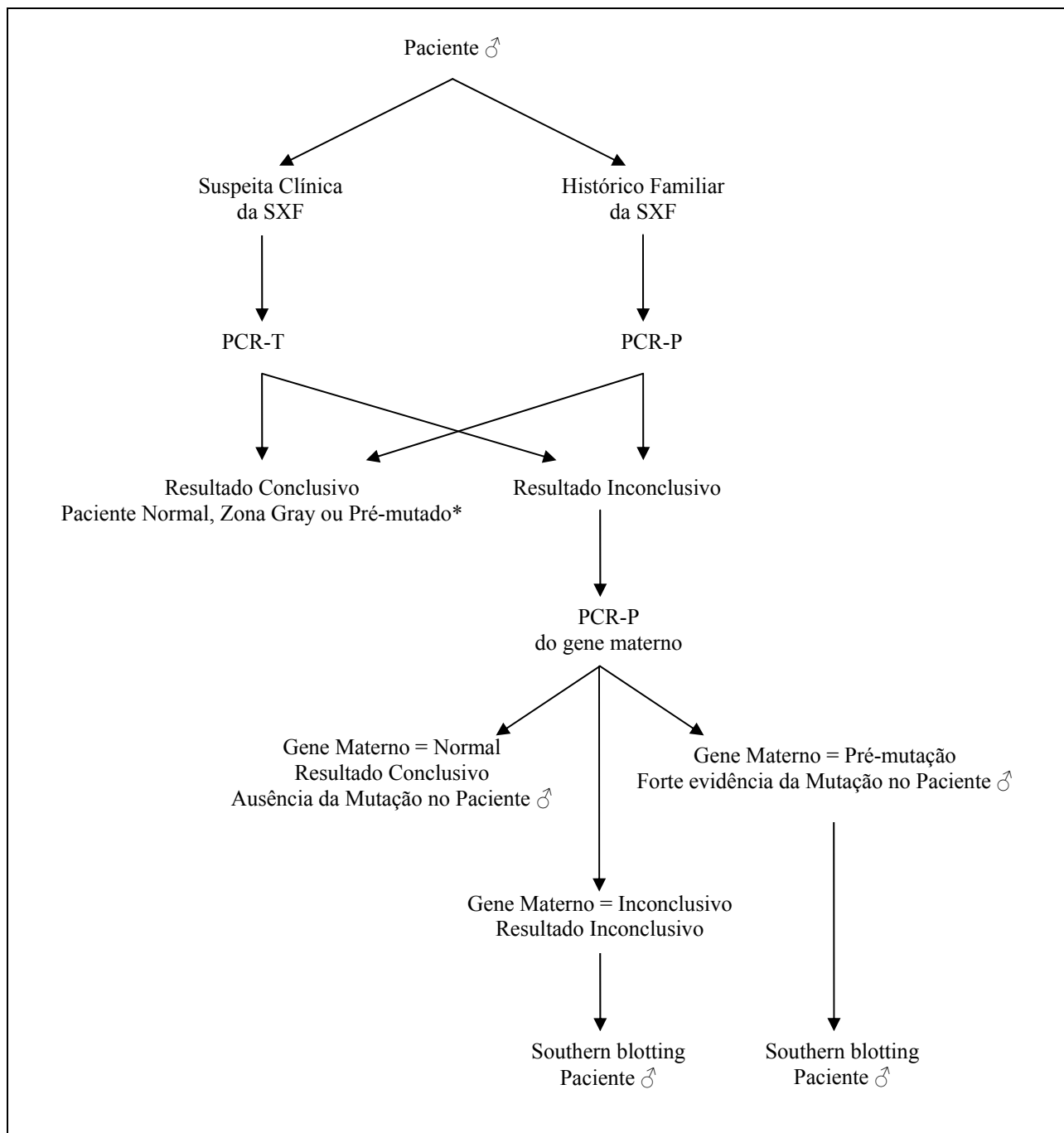


Figura 15. Fluxograma proposto para diagnóstico laboratorial da SXF em homens com suspeita clínica ou histórico familiar para a síndrome.

*Visualização de banda na faixa de pré-mutação somente quando realizada a PCR-P.

Para o diagnóstico laboratorial de homens com indicação clínica para a SXF, sugere-se que dois grupos sejam considerados: pacientes com suspeita clínica e pacientes com histórico familiar para a SXF. No estudo de pacientes com suspeita clínica a técnica

de PCR-T se mostrou confiável e pode ser utilizada, como já realizado em rotinas laboratoriais; para estudo de pacientes com histórico familiar, a pesquisa deve ser feita pela PCR-P, pois estes pacientes apresentam maior propensão à presença de pré-mutação, não evidenciada pela PCR-T. Além disso, casos de mosaicismo correm o risco de serem considerados normais pela PCR-T.

Resultados inconclusivos, provenientes da PCR-T ou PCR-P, devem seguir com a pesquisa da pré-mutação por PCR-P do gene materno do paciente em questão, uma vez que homens, obrigatoriamente, herdaram o cromossomo X da mãe.

Seguindo a mesma lógica da proposta de diagnóstico para pacientes do sexo feminino, temos: caso a mãe seja normal para a pesquisa da mutação no gene FMR1, o paciente em questão é normal para a SXF, por ter herdado o gene FMR1 normal. Resultados do gene materno inconclusivos ou com a presença de pré-mutação requerem o estudo por Southern blotting para definição do diagnóstico.

Todos os pacientes, tanto homens quanto mulheres, pertencentes a famílias já diagnosticadas como portadoras da SXF com padrão de mosaicismo, devem sempre realizar o estudo por Southern blotting, para investigação de maiores expansões de CGG. Nestes casos, esta técnica definirá a presença ou ausência de mutação com maior confiabilidade, auxiliando para um apropriado aconselhamento genético e tratamento da doença.

A rapidez e economia das técnicas de PCR justificam o seu uso em triagem no diagnóstico da SXF, mesmo quando incluídos os estudos de investigação familiar, e realização da PCR-P para gene materno e/ou paterno. A estratégia de diagnóstico sugerida parte do princípio de que todos os indivíduos afetados pela da SXF têm um ascendente com pré-mutação do gene FMR1. Portanto, pode-se descartar ou enfatizar a suspeita da SXF se realizado o teste PCR-P nos pais de cada paciente com diagnóstico inconclusivo. Assim, o estudo por Southern blotting será realizado somente em casos concretos de suspeita da síndrome e em pacientes com familiares portadores da SXF com padrão de mosaicismo.

A abordagem apresentada, embora não siga as instruções dos Guias Internacionais de Diagnóstico da SXF se enquadra nas condições laboratoriais, limitações e difícil acesso

de famílias a serviços de genética no Brasil. Os testes de PCR-T e PCR-P são de baixo custo e os equipamentos e espaço físico necessários para o procedimento são de fácil acesso, comparativamente ao teste de Southern blotting. A proposta principal deste trabalho é que seja implantada a utilização da PCR-P em larga escala nos laboratórios de diagnóstico de doenças genéticas, seguindo os protocolos nesta dissertação sugeridos, evitando o estudo por Southern blotting.

5.3 Rastreamento da Pré-mutação da Síndrome do X Frágil

A alta incidência da pré-mutação e mutação da SXF associada a avanços nos testes genéticos faz da doença uma forte candidata a estudos e rastreamento na população em geral (Crawford *et al.*, 2001). Para a prevenção da SXF, é importante a pesquisa da pré-mutação do gene FMR1 em mulheres em fase fértil como análise pré-concepcional de rotina. A frequência da pré-mutação na população feminina é alta (Ver Seção 2.4) e a análise pré-concepcional avalia a probabilidade de cada paciente vir a conceber uma criança afetada pela SXF, informa os riscos associados e possibilita, se desejado, a fertilização assistida. Devido à alta prevalência da pré-mutação e mutação para a SXF, Toledano-Alhadeff *et al.* (2001) avaliaram o custo-benefício do rastreamento da pré-mutação em mulheres, considerando o número esperado de nascimentos de pacientes afetados evitados, o número de mulheres diagnosticadas como portadoras da pré-mutação, o custo do teste no seu estudo (US\$ 100) e o custo de cuidados necessários durante a vida de um paciente afetado pela SXF (>US\$ 350.000). Concluíram que o rastreamento é rentável e deve ser realizado em larga escala.

Além da prevenção, há o interesse da identificação da POF e FXTAS associadas à pré-mutação da SXF. O teste genético para detecção da pré-mutação em larga escala deve ser de baixo custo, rápido e de fácil execução e manipulação. A técnica da PCR-P se enquadra nesse perfil de técnicas de rastreamento e, pelos bons resultados apresentados nesta pesquisa, representa uma ferramenta importante na prevenção e conclusão de diagnósticos da SXF em populações.

5.4 Novas Informações em Laudos de Pesquisa do Gene FMR1 por PCR

Os Guias Internacionais de Diagnóstico da SXF e o Guia de Boas Práticas em Laboratório de Genética recomendam que informações referentes à síndrome e ao método utilizado estejam presentes no laudo final de diagnóstico dos pacientes (Maddalena *et al.*, 2001; Biancalana *et al.*, 2006; Borovik *et al.*, 2006). As informações anexadas em laudos são de grande importância para os profissionais que avaliam o resultado da pesquisa da Síndrome do X Frágil. Os principais itens recomendados são:

- O tipo de amostra analisada (sangue periférico, bulbo capilar, células da mucosa oral).
- A descrição e referência do método utilizado, contendo sonda e enzimas, quando utilizado o Southern blotting e metodologia de separação e detecção, se utilizada a PCR.
- A classificação dos alelos definidos (normal, zona gray, pré-mutado ou mutação completa).
- A interpretação do resultado do exame, que deve ser compreensível a um profissional não geneticista.
- As principais limitações técnicas do método utilizado.
- Em casos de resultados positivos, a indicação de aconselhamento genético e investigação de familiares de risco, alertando para o risco de desenvolvimento de FXTAS para familiares com pré-mutação.
- Informar que o retardo mental associado a outros sítios frágeis, especialmente FRAXE, ou a outras mutações genéticas não podem ser detectados pela técnica.
- Considerar a análise cromossômica (cariótipo) em casos de retardo mental.

Sugerimos que, além das informações já estabelecidas, sejam também incluídos nos laudos de pesquisa do gene FMR1, dados de frequência de inconclusividade, normalidade, zona gray e pré-mutação da população com indicação clínica para a Síndrome do X Frágil quando analisados pela técnica de PCR utilizada.

Conforme os dados obtidos neste trabalho, considerando os resultados conclusivos e inconclusivos, as frequências observadas a partir da análise de amostras de 100 pacientes do sexo feminino com indicação clínica para a Síndrome do X Frágil foram: 88% inconclusivos, 2% zona gray e 10% normal, pela PCR-T; e 48% inconclusivos, 17% zona gray, 27 % normal e 8% pré-mutação, pela PCR-P. Destaca-se que a presença da frequência de resultados inconclusivos em laudos é especialmente importante para o profissional que o avalia. Ela informa se o resultado é o esperado para a população estudada, e pode auxiliar na decisão de novas medidas no diagnóstico do paciente.

A Figura 16 mostra modelos-sugestão de laudos para pacientes do sexo feminino, considerando as sugestões descritas acima.

Na análise de pacientes do sexo masculino, a amostragem estudada neste trabalho, 22 pacientes, não permite estipular tal frequência. Porém, nestes casos os resultados inconclusivos são sugestivos de paciente afetado pela síndrome e esta informação deve estar explicitada no laudo final.

| (a) LAUDO PADRÃO PARA PCR-T | (b) LAUDO PADRÃO PARA PCR-P |
|---|---|
| <u>Observação:</u> Os exames realizados por esta técnica normalmente reproduzem resultados com a frequência a seguir, quando analisadas amostras de pacientes do sexo feminino: 88% inconclusivos, 2% zona gray e 10% normal. | <u>Observação:</u> Os exames realizados por esta técnica normalmente reproduzem resultados com a frequência a seguir, quando analisadas amostras de pacientes do sexo feminino: 48% inconclusivos, 17% zona gray, 27 % normal e 8% pré-mutação. |

Figura 16. Laudo-sugestão para (a) PCR-T (Fu *et al.*, 1991) e (b) PCR-P (Saluto *et al.*, 2005) de pacientes do sexo feminino, mostrando no rodapé (no item Observação) os dados da incidência registrados nesta pesquisa.

A possibilidade da presença do mosaicismo, que pode não ser detectada dependendo da técnica utilizada, é também uma informação relevante ao profissional que avalia o laudo final. Neste trabalho quatro casos de mosaicismo foram detectados pela técnica de PCR-P, dois com alelos normais e pré-mutados e dois com alelos normais e zona gray, conforme abordado na seção 5.1.2. A técnica de PCR-T é limitada à detecção de alelos zona gray e, portanto, não detecta casos de mosaicismo de alelos normais com pré-mutados ou afetados. Já a técnica de PCR-P pode detectar casos de mosaicismo de alelos normais com zona gray e pré-mutados, mas não o mosaicismo com alelos afetados. Estas informações, assim como frequências de mosaicismo citadas na literatura, também podem ser mencionadas no laudo final no item “Observação”. Isto, por se enquadrarem nas informações referentes às limitações técnicas do método utilizado, um dos itens recomendados pelos Guias Internacionais de Diagnóstico da SXF e o Guia de Boas Práticas em Laboratório de Genética.

6. Considerações Finais

Mais de uma década após a expansão da repetição de CGG no gene FMR1 ser identificada como causa predominante do desenvolvimento da Síndrome do X Frágil (SXF), várias técnicas de diagnóstico foram desenvolvidas. O diagnóstico por técnicas moleculares é o mais utilizado atualmente, principalmente a combinação das técnicas de Southern blotting e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Embora o uso de técnicas moleculares tenha promovido um grande avanço no diagnóstico da SXF, ainda existem barreiras de ordem econômica e técnica que dificultam sua utilização. As principais desvantagens do uso da técnica de Southern blotting para diagnóstico da SXF são o alto custo e a dificuldade de diferenciação entre alelos normais próximos à zona gray, os de zona gray e os pré-mutados de baixa expansão. Por outro lado, as técnicas de PCR e ms-PCR apresentam baixa sensibilidade na detecção de alelos pré-mutados e com mutação completa, especialmente em indivíduos do sexo feminino.

As repetições de CGG, presentes no gene FMR1, alvo de pesquisa no diagnóstico da SXF, formam estruturas secundárias que dificultam a amplificação dos alelos. Vários métodos de PCR já foram descritos com diferentes combinações de 7-deaza-dGTP, betaina, DMSO e polimerases diversas, no intuito de melhorar a eficácia da técnica na amplificação das repetições de CGG.

O uso combinado do Southern blotting e PCR produz um resultado de diagnóstico confiável para a SXF; no entanto, o procedimento todo é laborioso e requer muito tempo para a definição do diagnóstico (Zhou *et al.*, 2004).

Este trabalho teve por objetivo principal a avaliação e estudo comparativo de duas técnicas de PCR no diagnóstico da Síndrome do X Frágil. As técnicas selecionadas no estudo foram a PCR de Triagem (PCR-T), descrita por Fu e colaboradores em 1991, e a *Enhanced* PCR ou PCR para Pré-mutação (PCR-P) – como designada neste trabalho – desenvolvida por Saluto e colaboradores em 2005. A principal diferença no protocolo da PCR-P é a adição da betaina e Expand Long Template PCR System. Essa combinação

facilita a detecção da expansão de repetição de CGG e dispensa procedimentos caros e demorados como a hibridização com sondas radioativas ou quimioluminescentes na visualização de alelos de grandes expansões de CGG, particularmente na faixa de pré-mutação, acima de 60 repetições.

6.1 Conclusões

Neste trabalho foram realizadas análises de DNA genômico de 122 pacientes. O estudo evidenciou que a técnica padrão utilizada para diagnóstico da SXF, a PCR de triagem, produz resultados (diagnósticos) conclusivos em apenas um quarto dos casos (26%); por outro lado, os ensaios realizados com a nova técnica de PCR (*Enhanced* PCR), proposta por Saluto e colaboradores (PCR-P), apresentaram 60% de resultados conclusivos, um avanço muito significativo no diagnóstico de pacientes da SXF.

Essa diferença é mais acentuada quando se comparam exclusivamente pacientes do sexo feminino. Nestes casos, apenas 12% foram conclusivos pela técnica de PCR-T, enquanto a análise pela técnica de PCR-P resultou em 52% de diagnósticos conclusivos. A técnica de PCR-P revelou maior eficácia na amplificação dos dois alelos, mesmo aqueles na faixa da normalidade, e na definição do diagnóstico das pacientes analisadas. Portanto, os resultados deste trabalho mostraram que a técnica *Enhanced* PCR promove uma significativa melhora na conclusividade de diagnósticos de pacientes do sexo feminino.

Nas análises realizadas neste trabalho, a PCR-T permitiu a visualização de alelos normais e zona gray. Os maiores alelos amplificados continham 41 repetições de CGG em paciente do sexo feminino e 46 repetições de CGG em paciente do sexo masculino. O método de PCR-P amplificou alelos com grande número de repetições de CGG, sendo que os maiores alelos detectados continham 130 repetições de CGG em paciente do sexo feminino e 93 repetições de CGG em paciente do sexo masculino. Nenhum alelo com mutação completa (>200 CGG) foi observado em nenhuma das técnicas. Assim, os resultados mostram que a técnica de PCR-P registra casos de diagnóstico positivo para pré-mutação, não detectados quando analisados pela técnica de PCR-T, para os dois sexos.

A PCR-P foi a única a diagnosticar pacientes com pré-mutação e todos os casos identificados foram provenientes de pacientes com histórico familiar para a síndrome. A técnica apresentou maior confiabilidade no estudo de famílias portadoras da SXF e enfatiza

a necessidade de complementação do diagnóstico por outra técnica, em adição à PCR-T, a técnica padrão atualmente utilizada nos laboratórios de genética humana. Além disso, casos de mosaïcismo, isto é, quando há variação alélica em diferentes células do mesmo paciente, com alelo normal e pré-mutado em homens, foram classificados como normais pela PCR-T e o alelo pré-mutado detectado apenas pela PCR-P. Em casos de mosaïcismo, é importante salientar que o Southern blotting deve ser indicado para descartar a possibilidade de não detecção de grandes expansões.

A utilização de diferentes técnicas de PCR pode produzir resultados diferentes quanto ao número de repetições de trinucleotídeos. Nos casos analisados neste trabalho, utilizando PCR-T e PCR-P, detectou-se variação no número de repetições para um mesmo indivíduo, em 59% dos pacientes. Esta variação não influenciou no diagnóstico e classificação dos pacientes, ou seja, não mudou o enquadramento de nenhum dos indivíduos na classificação normal, zona gray, pré-mutado. Porém, é importante considerar as manifestações clínicas e o histórico familiar de cada indivíduo, pois número de repetições de CGG, provavelmente não define isoladamente a classificação final dos pacientes. Amostras analisadas em duplicata, isto é, repetição do exame de uma amostra pela mesma técnica, também revelaram variação do número de repetições de CGG. Os resultados indicam possível presença de um erro de medida do número de repetições de CGG (estimado em cerca de 4 CGG e 2 CGG para PCR-T e PCR-P, respectivamente), provavelmente devido a artefatos técnicos. Este erro pode ser considerado nos resultados de PCR-T e PCR-P.

Outro objetivo específico atingido neste trabalho foi a avaliação da frequência alélica da população do Estado de Santa Catarina. Dos alelos identificados nos 115 pacientes residentes neste estado (dos 122 estudados neste trabalho), e analisados quanto ao número de repetições de CGG, pelas duas técnicas, pode-se sugerir que os alelos de 28 e 30 repetições de CGG são os mais comumente observados nesta população. O resultado é similar a outras pesquisas de frequências alélicas do loco FRAXA do gene FMR1 (Brown *et al.*, 1993).

Muitos laboratórios utilizam testes de PCR como triagem no diagnóstico da SXF e realizam o teste de Southern blotting em amostras com diagnóstico inconclusivo pela PCR. Um resultado importante deste trabalho é a proposta de uma nova estratégia de

diagnóstico. A estratégia parte do princípio de que todos os indivíduos afetados pela SXF têm um ascendente com pré-mutação do gene FMR1. Portanto, pode-se descartar ou enfatizar a suspeita da SXF se realizado o teste de PCR-P nos pais daqueles pacientes com diagnóstico inconclusivo. Assim, o estudo por Southern blotting deverá ser realizado somente em casos concretos de suspeita da síndrome e em pacientes com familiares portadores da SXF com padrão de mosaicismo. A estratégia proposta, embora não de acordo com as recomendações de Guias Internacionais de Diagnóstico da SXF, representa uma abordagem adequada para os padrões do Brasil, onde existem limitações no atendimento de famílias nos serviços de genética clínica e nas condições laboratoriais. O método de PCR para Pré-mutação é simples e robusto, e pode ser utilizado como técnica de triagem na detecção de expansões de repetições de CGG do gene FMR1. Portanto, sugere-se que essa técnica seja implantada em larga escala nos laboratórios de diagnóstico de doenças genéticas, seguindo os protocolos aqui sugeridos, evitando o estudo por Southern blotting.

Em virtude do baixo custo, rapidez e fácil detecção de pré-mutações, a técnica da PCR-P representa uma ferramenta importante na prevenção e conclusão de diagnósticos da SXF. Assim essa técnica pode ser aplicada no estudo de populações para detecção da pré-mutação em larga escala. O diagnóstico de portadoras da pré-mutação pode prevenir o aparecimento de novos casos da doença e casos de gravidez de risco podem ser monitorados. Para prevenção da SXF, também é importante a pesquisa da pré-mutação do gene FMR1 em mulheres em fase fértil como análise pré-concepcional de rotina. A análise pré-natal e o rastreamento de crianças em idade escolar também são de grande importância para controle, diagnóstico e tratamento da síndrome.

Laboratórios frequentemente utilizam mais de uma técnica no diagnóstico de doenças genéticas, pois nenhuma delas pode detectar todos os tipos de mutações igualmente ou com a mesma precisão. Mutações de ponto ou deleções no gene FMR1 não podem ser detectadas pelas técnicas de PCR ou Southern blotting. Nota-se no entanto que estes casos são raros e o diagnóstico só será definido pelo sequenciamento do gene, que pode ser considerado se a clínica do paciente for consistente para a SXF e os outros métodos já foram esgotados. Os desafios para os laboratórios de genética clínica são manter-se atualizados em meio à explosão de informações que existem na área, oferecer

técnicas modernas no diagnóstico e assegurar que os resultados obtidos sejam utilizados de forma ética, moral e com responsabilidade social, fato também destacado por Leonard (1999), em seu trabalho “The Future of Molecular Genetic Testing”.

6.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

- Avaliação de técnica similar a PCR-P para diagnóstico da Síndrome do X Frágil, loco FRAXE.
- Verificação da frequência de portadores na população geral, utilizando a ferramenta de PCR-P
- Estudo de prevalência de pré-mutação também em homens acima de 50 anos com tremor e ataxia, para correto diagnóstico de FXTAS
- Estudo de associação de sintomas clínicos como autismo, déficit de atenção e hiperatividade em meninos com pré-mutação, avaliação em familiares de afetados.

7. Referências Bibliográficas

- Ashley, C. T., Jr., K. D. Wilkinson, D. Reines e S. T. Warren. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. Science, v.262, n.5133, Oct 22, p.563-6. 1993.
- Ashley, C. T., J. S. Sutcliffe, C. B. Kunst, H. A. Leiner, E. E. Eichler, D. L. Nelson e S. T. Warren. Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. Nat Genet, v.4, n.3, Jul, p.244-51. 1993.
- Bakker, C. E., C. V. Verheij, R. W. Willemsen, R. Van Der Helm, F. Oerlemans, M. Vermey, A. Bygrave, A. T. Hoogeveen, B. A. Oostra, E. Reyniers, K. De Boule, R. D'hooge, P. Cras, D. Van Velzen, G. Nagels, J. Martin, P. P. De Deyn, J. K. Darby e P. J. Willems. Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. Cell, v.78, n.1, Jul 15, p.23-33. 1994.
- Barch, M. J., T. Knutsen e J. L. Spurbeck. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. New York: Lippincott – Raven Publishers, p. 500. 1997
- Bardoni, B. e J. L. Mandel. Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. Curr Opin Genet Dev, v.12, n.3, Jun, p.284-93. 2002.
- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell e D. L. Wheeler. GenBank. Nucleic Acids Res, v.34, n.Database issue, Jan 1, p.D16-20. 2006.
- Biancalana, V., P. Steinbach e S. Stenhouse. Draft Best Practice Guidelines for Molecular Analysis in Fragile X Syndrome. Disponível em <http://www.emqn.org/emqn/BestPractice.html>. 2006.
- Borovik, C. L., E. H. Tajara, J. C. Rocha, L. M. S. Farah, N. F. Naccache, R. C. N. Mingroni e R. Joffe. Guia de Boas Práticas Laboratoriais em Citogenética e Genética Molecular Humana. Disponível em <http://www.sbg.org.br/>. Acessado em dezembro de 2006. 2006.
- Brown, W. T., G. E. Houck, Jr., A. Jeziorowska, F. N. Levinson, X. Ding, C. Dobkin, N. Zhong, J. Henderson, S. S. Brooks e E. C. Jenkins. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. Jama, v.270, n.13, Oct 6, p.1569-75. 1993.
- Coffee, B., F. Zhang, S. T. Warren e D. Reines. Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. Nat Genet, v.22, n.1, May, p.98-101. 1999.

- Cornish, K., C. Kogan, J. Turk, T. Manly, N. James, A. Mills e A. Dalton. The emerging fragile X premutation phenotype: evidence from the domain of social cognition. Brain Cogn, v.57, n.1, Feb, p.53-60. 2005.
- Crawford, D. C., J. M. Acuna e S. L. Sherman. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. Genet Med, v.3, n.5, Sep-Oct, p.359-71. 2001.
- Crawford, D. C., K. L. Meadows, J. L. Newman, L. F. Taft, E. Scott, M. Leslie, L. Shubek, P. Holmgren, M. Yeargin-Allsopp, C. Boyle e S. L. Sherman. Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans. Am J Med Genet, v.110, n.3, Jul 1, p.226-33. 2002.
- De Boulle, K., A. J. Verkerk, E. Reyniers, L. Vits, J. Hendrickx, B. Van Roy, F. Van Den Bos, E. De Graaff, B. A. Oostra e P. J. Willems. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. Nat Genet, v.3, n.1, Jan, p.31-5. 1993.
- Eichler, E. E., J. J. Holden, B. W. Popovich, A. L. Reiss, K. Snow, S. N. Thibodeau, C. S. Richards, P. A. Ward e D. L. Nelson. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. Nat Genet, v.8, n.1, Sep, p.88-94. 1994.
- Eichler, E. E., S. Richards, R. A. Gibbs e D. L. Nelson. Fine structure of the human FMR1 gene. Hum Mol Genet, v.3, n.4, Apr, p.684-5. 1994.
- Farzin, F., H. Perry, D. Hessel, D. Loesch, J. Cohen, S. Bacalman, L. Gane, F. Tassone, P. Hagerman e R. Hagerman. Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation. J Dev Behav Pediatr, v.27, n.2 Suppl, Apr, p.S137-44. 2006.
- Feng, Y., F. Zhang, L. K. Lokey, J. L. Chastain, L. Lakkis, D. Eberhart e S. T. Warren. Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. Science, v.268, n.5211, May 5, p.731-4. 1995.
- Fu, Y. H., D. P. Kuhl, A. Pizzuti, M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, S. Richards, A. J. Verkerk, J. J. Holden, R. G. Fenwick, Jr., S. T. Warren e Et Al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. Cell, v.67, n.6, Dec 20, p.1047-58. 1991.
- Gacy, A. M., G. Goellner, N. Juranic, S. Macura e C. T. McMurray. Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro. Cell, v.81, n.4, May 19, p.533-40. 1995.
- Godde, R., D. A. Akkad, L. Arning, G. Dekomien, J. Herchenbach, E. Kunstmann, M. Meins, S. Wieczorek, J. T. Epplen e S. Hoffjan. Electrophoresis of DNA in human genetic diagnostics - state-of-the-art, alternatives and future prospects. Electrophoresis, v.27, n.5-6, Mar, p.939-46. 2006.

- Gold, B., D. Radu, A. Balanko e C. S. Chiang. Diagnosis of Fragile X syndrome by Southern blot hybridization using a chemiluminescent probe: a laboratory protocol. Mol Diagn, v.5, n.3, Sep, p.169-78. 2000.
- Graphpad. InStat. GraphPad Software Inc. San Diego, California, USA Copyright 1992-1998.
- Grenier, B., M. Dubreuil e D. Journois. Comparison of two measurement methods: the Bland and Altman assessment. Ann Fr Anesth Reanim, v.19, n.2, Feb, p.128-35. 2000.
- Hagerman, P. J. e R. J. Hagerman. The Fragile-X Premutation: A Maturing Perspective. Am. J. Hum. Genet., n.74, p.805-816. 2004.
- _____. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). Ment Retard Dev Disabil Res Rev, v.10, n.1, p.25-30. 2004.
- Hagerman, R. J. e P. J. Hagerman. The fragile X premutation: into the phenotypic fold. Curr Opin Genet Dev, v.12, n.3, Jun, p.278-83. 2002a.
- _____. Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research: The Johns Hopkins University Press. 2002b. 540 p.
- Hammond, L. S., M. M. Macias, J. C. Tarleton e G. Shashidhar Pai. Fragile X syndrome and deletions in FMR1: new case and review of the literature. Am J Med Genet, v.72, n.4, Nov 12, p.430-4. 1997.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak e P. M. Williams. Real time quantitative PCR. Genome Res, v.6, n.10, Oct, p.986-94. 1996.
- Heitz, D., D. Devys, G. Imbert, C. Kretz e J. L. Mandel. Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. J Med Genet, v.29, n.11, Nov, p.794-801. 1992.
- Henke, W., K. Herdel, K. Jung, D. Schnorr e S. A. Loening. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. Nucleic Acids Res, v.25, n.19, Oct 1, p.3957-8. 1997.
- Hinds, H. L., C. T. Ashley, J. S. Sutcliffe, D. L. Nelson, S. T. Warren, D. E. Housman e M. Schalling. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. Nat Genet, v.3, n.1, Jan, p.36-43. 1993.
- Innis M a, G. D. H., Sminsky J S, White T J. PCR protocols: a guide to methods and applications. Orlando, FL. 1990
- Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. S. Sminsky e T. J. White. PCR protocols: a guide to methods and applications. Orlando, FL. 1990

- Jacky, P. B., Y. R. Ahuja, K. Anyane-Yeboa, W. R. Breg, N. J. Carpenter, U. G. Froster-Iskenius, J. P. Fryns, T. W. Glover, K. H. Gustavson, S. F. Hoegerman e Et Al. Guidelines for the preparation and analysis of the fragile X chromosome in lymphocytes. Am J Med Genet, v.38, n.2-3, Feb-Mar, p.400-3. 1991.
- Jacquemont, S., R. J. Hagerman, M. Leehey, J. Grigsby, L. Zhang, J. A. Brunberg, C. Greco, V. Des Portes, T. Jardini, R. Levine, E. Berry-Kravis, W. T. Brown, S. Schaeffer, J. Kissel, F. Tassone e P. J. Hagerman. Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. Am J Hum Genet, v.72, n.4, Apr, p.869-78. 2003.
- Jin, P. e S. T. Warren. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. Hum Mol Genet, v.9, n.6, Apr 12, p.901-8. 2000.
- Kunst, C. B. e S. T. Warren. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. Cell, v.77, n.6, Jun 17, p.853-61. 1994.
- Lachiewicz, A. M., D. V. Dawson, G. A. Spiridigliozzi e A. Mcconkie-Rosell. Arithmetic difficulties in females with the fragile X premutation. Am J Med Genet A, v.140, n.7, Apr 1, p.665-72. 2006.
- Lee, T. H., C. M. Blasey, J. Dyer-Friedman, B. Glaser, A. L. Reiss e S. Eliez. From research to practice: teacher and pediatrician awareness of phenotypic traits in neurogenetic syndromes. Am J Ment Retard, v.110, n.2, Mar, p.100-6. 2005.
- Leonard, D. G. B. The Future of Molecular Genetic Testing. Clinical Chemistry, v.45, n.5, p.726-731. 1999.
- Lubs, H. A. A marker X chromosome. Am J Hum Genet, v.21, n.3, May, p.231-44. 1969.
- Maddalena, A., C. S. Richards, M. J. McGinniss, A. Brothman, R. J. Desnick, R. E. Grier, B. Hirsch, P. Jacky, G. A. McDowell, B. Popovich, M. Watson e D. J. Wolff. Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee. Edição 2006. Disponível em www.acmg.net/resources/policy-list.asp. Genet Med, v.3, n.3, May-Jun, p.200-5. 2001.
- Martin, J. P. e J. Bell. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, n.6, p.154. 1943.
- Mitchell, R. J., J. J. Holden, C. Zhang, Y. Curlis, H. R. Slater, T. Burgess, K. C. Kirkby, A. Carmichael, K. D. Heading e D. Z. Loesch. FMR1 alleles in Tasmania: a screening study of the special educational needs population. Clin Genet, v.67, n.1, Jan, p.38-46. 2004.

- Murray, A., J. N. Macpherson, M. C. Pound, A. Sharrock, S. A. Youings, N. R. Dennis, N. McKechnie, P. Linehan, N. E. Morton e P. A. Jacobs. The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE alleles during transmission. Hum Mol Genet, v.6, n.2, Feb, p.173-84. 1997.
- Nolin, S. L., W. T. Brown, A. Glicksman, G. E. Houck, Jr., A. D. Gargano, A. Sullivan, V. Biancalana, K. Brondum-Nielsen, H. Hjalgrim, E. Holinski-Feder, F. Kooy, J. Longshore, J. Macpherson, J. L. Mandel, G. Matthijs, F. Rousseau, P. Steinbach, M. L. Vaisanen, H. Von Koskull e S. L. Sherman. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. Am J Hum Genet, v.72, n.2, Feb, p.454-64. 2003.
- Oostra, B. A. e R. Willemsen. Diagnostic tests for fragile X syndrome. Expert Rev Mol Diagn, v.1, n.2, Jul, p.226-32. 2001.
- Parrish, J. E., B. A. Oostra, A. J. Verkerk, C. S. Richards, J. Reynolds, A. S. Spikes, L. G. Shaffer e D. L. Nelson. Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE. Nat Genet, v.8, n.3, Nov, p.229-35. 1994.
- Pena, S. D. J. e R. Sturzeneker. Letters to the Editor. Molecular Barr Bodies: Methylation-Specific PCR of the Human X-Linked Gene FMR-1 for Diagnosis of Klinefelter Syndrome. American Society of Andrology, Journal of Andrology, Vol. 24, No. 6 2003
- Pergolizzi, R. G., S. H. Erster, P. Goonewardena e W. T. Brown. Detection of full fragile X mutation. Lancet, v.339, n.8788, Feb 1, p.271-2. 1992.
- Ramos, F. J., B. S. Emanuel e N. B. Spinner. Frequency of the common fragile site at Xq27.2 under conditions of thymidylate stress: implications for cytogenetic diagnosis of the fragile-X syndrome. Am J Med Genet, v.42, n.6, Apr 1, p.835-8. 1992.
- Rose, E. A. Applications of the polymerase chain reaction to genome analysis. The FASEB Journal, v.5, p.46-54. 1991.
- Rousseau, F., D. Heitz, V. Biancalana, S. Blumenfeld, C. Kretz, J. Boue, N. Tommerup, C. Van Der Hagen, C. Delozier-Blanchet, M. F. Croquette e Et Al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. N Engl J Med, v.325, n.24, Dec 12, p.1673-81. 1991.
- Rousseau, F., P. Rouillard, M. L. Morel, E. W. Khandjian e K. Morgan. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene--and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. Am J Hum Genet, v.57, n.5, Nov, p.1006-18. 1995.

- Saluto, A., A. Brussino, F. Tassone, C. Arduino, C. Cagnoli, P. Pappi, P. Hagerman, N. Migone e A. Brusco. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. J Mol Diagn, v.7, n.5, Nov, p.605-12. 2005.
- Sherman, S., B. A. Pletcher e D. A. Driscoll. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. Genet Med, v.7, n.8, Oct, p.584-7. 2005.
- Sherman, S. L. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. Am J Med Genet, v.97, n.3, Fall, p.189-94. 2000.
- Sherman, S. L., P. A. Jacobs, N. E. Morton, U. Froster-Iskenius, P. N. Howard-Peebles, K. B. Nielsen, M. W. Partington, G. R. Sutherland, G. Turner e M. Watson. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. Hum Genet, v.69, n.4, p.289-99. 1985.
- Siegel, S. Estatística Não-Paramétrica para as Ciências do Comportamento. São Paulo: Editora McGraw-Hill. 1975
- SPSS. SPSS 13.0 for Windows. L. T. Inc. Chicago, USA 1989 - 2004.
- Statistica. Data Analysis Software System. S. Inc. Melbourne, Australia 2001.
- Steiner, C. E., M. M. Guerreiro, A. P. Marques-De-Faria e I. Lopes-Cendes. Laboratorial diagnosis of fragile-X syndrome: experience in a sample of individuals with pervasive developmental disorders. Arq Neuropsiquiatr, v.63, n.3A, Sep, p.564-70. 2005.
- Sullivan, A. K., D. C. Crawford, E. H. Scott, M. L. Leslie e S. L. Sherman. Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range. Am J Hum Genet, v.70, n.6, Jun, p.1532-44. 2002.
- Tassone, F., R. J. Hagerman, A. K. Taylor, L. W. Gane, T. E. Godfrey e P. J. Hagerman. Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. Am J Hum Genet, v.66, n.1, Jan, p.6-15. 2000.
- Toledano-Alhadeff, H., L. Basel-Vanagaite, N. Magal, B. Davidov, S. Ehrlich, V. Drasinover, E. Taub, G. J. Halpern, N. Ginott e M. Shohat. Fragile-X carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel. Am J Hum Genet, v.69, n.2, Aug, p.351-60. 2001.
- Van Den Ouweland, A. M., W. H. Deelen, C. B. Kunst, M. L. Uzielli, D. L. Nelson, S. T. Warren, B. A. Oostra e D. J. Halley. Loss of mutation at the FMR1 locus through multiple exchanges between maternal X chromosomes. Hum Mol Genet, v.3, n.10, Oct, p.1823-7. 1994.

- Verheij, C., E. De Graaff, C. E. Bakker, R. Willemsen, P. J. Willems, N. Meijer, H. Galjaard, A. J. Reuser, B. A. Oostra e A. T. Hoogeveen. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. Hum Mol Genet, v.4, n.5, May, p.895-901. 1995.
- Verkerk, A. J., M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, Y. H. Fu, D. P. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M. F. Victoria, F. P. Zhang e Et Al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell, v.65, n.5, May 31, p.905-14. 1991.
- Wheeler, D. L., T. Barrett, D. A. Benson, S. H. Bryant, K. Canese, V. Chetvernin, D. M. Church, M. Dicuccio, R. Edgar, S. Federhen, L. Y. Geer, W. Helmberg, Y. Kapustin, D. L. Kenton, O. Khovayko, D. J. Lipman, T. L. Madden, D. R. Maglott, J. Ostell, K. D. Pruitt, G. D. Schuler, L. M. Schriml, E. Sequeira, S. T. Sherry, K. Sirotkin, A. Souvorov, G. Starchenko, T. O. Suzek, R. Tatusov, T. A. Tatusova, L. Wagner e E. Yaschenko. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res, v.34, n.Database issue, Jan 1, p.D173-80. 2006.
- Willemsen, R., C. J. Bontekoe, L. A. Severijnen e B. A. Oostra. Timing of the absence of FMR1 expression in full mutation chorionic villi. Hum Genet, v.110, n.6, Jun, p.601-5. 2002.
- Willemsen, R., S. Mohkamsing, B. De Vries, D. Devys, A. Van Den Ouweland, J. L. Mandel, H. Galjaard e B. Oostra. Rapid antibody test for fragile X syndrome. Lancet, v.345, n.8958, May 6, p.1147-8. 1995.
- Willemsen, R., A. Smits, S. Mohkamsing, H. Van Beerendonk, A. De Haan, B. De Vries, A. Van Den Ouweland, E. Sistermans, H. Galjaard e B. A. Oostra. Rapid antibody test for diagnosing fragile X syndrome: a validation of the technique. Hum Genet, v.99, n.3, Mar, p.308-11. 1997.
- Zeesman, S., L. Zwaigenbaum, D. T. Whelan, R. J. Hagerman, F. Tassone e S. A. Taylor. Paternal transmission of fragile X syndrome. Am J Med Genet A, v.129, n.2, Aug 30, p.184-9. 2004.
- Zhou, Y., H. Y. Law, C. D. Boehm, C. S. Yoon, G. R. Cutting, I. S. Ng e S. S. Chong. Robust fragile X (CGG)_n genotype classification using a methylation specific triple PCR assay. J Med Genet, v.41, n.4, Apr, p.e45. 2004.
- Zhou, Y., J. M. Lum, G. H. Yeo, J. Kiing, S. K. Tay e S. S. Chong. Simplified molecular diagnosis of fragile X syndrome by fluorescent methylation-specific PCR and GeneScan analysis. Clin Chem, v.52, n.8, Aug, p.1492-500. 2006.